

**Expressionsanalyse des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140  
(NCAM-140) in humanen Gliomen im Vergleich zu anderen  
Hirntumoren und zu zerebralem Autopsiegewebe**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von            Pedro Dünisch

geboren am  27.09.1980 in Suhl

## **Gutachter**

1. Prof. Dr. med. R. Kalff, Klinik für Neurochirurgie, Erlanger Allee 101, 07747 Jena
2. Prof. Dr. med. G. Schackert, Klinik für Neurochirurgie, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden
3. Prof. Dr. med. Ch. Mavrin, Institut für Neuropathologie, Erlanger Allee 101, 07747 jena

**Adelheid Finn**

**( \* 1921 † 2003)**

*Des Lebens Pulse schlagen frisch lebendig,  
Ätherische Dämmerung milde zu begrüßen;  
Du, Erde, warst auch diese Nacht beständig  
Und atmest neu erquickt zu meinen Füßen,  
Beginnest schon, mit Lust mich zu umgeben,  
Zum höchsten Dasein immerfort zu streben.*

*(J. W. v. Goethe: Faust ,II Teil)*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>01</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>04</b>
2.1. Das gesunde Gehirn .....	04
2.2. Aufbau und Funktion des zentralen Nervensystems.....	04
2.3. Aufbau und Funktion der Nervenzelle .....	05
2.4. Funktion und Vorkommen von Gliagewebe .....	05
2.4.1. Astrozyten .....	06
2.4.2. Oligodendrozyten .....	06
2.4.3. Mikroglia .....	06
2.4.4. Ependymzellen.....	07
2.5. Das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) .....	07
2.5.1. Struktur und Isoformen.....	07
2.5.2. Bindungsverhalten und die Bedeutung bei Zell-Zell-Kontakten .....	08
2.5.3. Entstehung des polysialysierten NCAM (PSA-NCAM), Vorkommen und Funktion.....	09
2.5.4. In situ und in vitro Studien über die Expression von NCAM.....	10
2.6. Kaskade des autonomen Zellwachstums.....	12
2.6.1. Neoplastische Läsionen des ZNS .....	12
2.6.1.1. WHO-Klassifikation .....	13
2.6.2. Humane Gliome .....	14
2.6.2.1. Astrozytome .....	15
2.6.2.1.1. Glioblastoma multiforme.....	15
2.6.2.2. Oligodendrogliome .....	16
2.6.2.3. Mischgliome .....	16
2.6.2.4. Ependymome.....	17
2.6.3. Humane Meningeome.....	17
2.6.4. Hypophysenadenome .....	17
2.6.5. Hirnmetastasen.....	18
<b>3. Fragestellung und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>20</b>

<b>4. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
4.1. Materialien und Geräte	21
4.1.1. Gewebeproben	21
4.1.2. Materialien	22
4.1.3. Geräte	23
4.2. Methoden	24
4.2.1. Herstellung der Lösungen und Puffer	24
4.2.2. Herstellung der Gewebeschnitte	25
4.2.3. Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie	25
4.2.4. Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung	25
4.2.5. Antigenmarkierung mit dem Primärantikörper	26
4.2.6. Verfahren und Durchführung der Immundetektion	26
4.2.6.1. Biochemisches Verfahrensprinzip	26
4.2.6.2. Technische Durchführung der Immundetektion	27
4.2.7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für die Lichtmikroskopie	28
4.2.8. Doppelte Durchführung der Experimente und Bewertung durch mehrere Untersucher	28
4.2.9. Messmethoden und Auswertung	28
4.2.9.1. Makroskopische Bewertung der Gewebeschnitte	28
4.2.9.2. Lichtmikroskopische Analyse	29
4.2.9.3. Densitometrische Auswertung der Expressionsstärke	30
4.2.9.4. Statistische Auswertung	31
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
5.1. Makroskopische Analyse der NCAM-140-Expression	32
5.1.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe	32
5.1.2. NCAM-140 in Gliomen	32
5.1.3. NCAM-140 in anderen Hirntumoren	34
5.2. Mikroskopische Analyse der NCAM-140-Expression	36
5.2.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe	36
5.2.2. NCAM-140 in Gliomen	37
5.2.3. NCAM-140 in anderen Hirntumoren	48

5.3. Densitometrische Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität .....	53
5.3.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe .....	53
5.3.2. NCAM-140 in Gliomen .....	53
5.3.3. NCAM-140 in anderen Hirntumoren .....	59
5.4. Visualisierung der Tumorgrenze in humanen Glioblastomen vom WHO-Grad IV anhand der NCAM-140-Negativität.....	63
5.4.1. NCAM-140-Intensitätsunterschiede in Bezug zur Tumorgrenze .....	63
5.4.2. Visualisierung der verschiedenen Invasionsformen .....	65
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>68</b>
6.1. Einführung .....	68
6.2. Bewertung der genutzten Analyseverfahren .....	69
6.2.1. Makroskopische Analyse .....	69
6.2.2. Lichtmikroskopische Analyse .....	69
6.2.3. Densitometrische Analyse .....	70
6.3. Ergebnisse der makroskopischen Auswertung.....	71
6.3.1. Gesunde graue Hirnsubstanz exprimiert gegenüber allen untersuchten Gewebe makroskopisch die höchste Menge an NCAM-140.....	71
6.3.2. Malignitätsgrad der Gliome und Expression von NCAM-140 verhalten sich reziprok .....	72
6.3.3. Andere intrakranielle Tumore .....	72
6.3.4. Ergebnisbewertung .....	73
6.4. Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung.....	74
6.4.1. Die gesunde graue Hirnsubstanz exprimiert gegenüber allen untersuchten Gewebe mikroskopisch die höchste Menge an NCAM-140.....	74
6.4.2. Malignitätsgrad der Gliome und die Expression von NCAM-140 verhalten sich reziprok .....	74
6.4.3. Andere intrakranielle Tumore .....	76
6.5. Ergebnisse der densitometrischen Auswertung .....	76
6.5.1. Gesunde graue Hirnsubstanz exprimiert gegenüber allen untersuchten Gewebe mikroskopisch die höchste Menge an NCAM-140.....	76
6.5.2. Malignitätsgrad der Gliome und Expression von NCAM-140 verhalten sich reziprok.....	77
6.5.3. Andere intrakranielle Tumore .....	77

6.6. Mögliche Bedeutung von NCAM-140 bei der malignen Tumorprogression.....	78
6.7. Visualisierung der Invasionszone in humanen Gliomen.....	82
6.8. NCAM-Expression in nichtgliomatösen intrakraniellen Tumoren.....	82
6.9. NCAM-Expression bei der Funktion anderer neuraler Prozesse.....	87
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>8. Danksagung</b>	
<b>9. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

## 1. Zusammenfassung

Bei Gliomen handelt es sich um Tumore des neuroepithelialen Gewebes, die entsprechend histopathologischer Kriterien in die WHO-Grade I bis IV eingeteilt werden (Schlegel et al. 2003). Die WHO-Grade korrelieren weitestgehend mit der Prognose der betroffenen Patienten, dass heißt mit steigendem WHO-Grad verschlechtert sich die Prognose (Behin et al. 2003).

Gliome des Erwachsenen zeichnen sich in der Regel durch eine ausgeprägte Invasion in das umgebende Hirngewebe aus (Sanson et al. 2004, Liotta et al. 1982). Daher werden für die Behandlung, insbesondere maligner Gliome aggressive Behandlungsstrategien eingesetzt. Zu diesen Therapien gehören die operative Entfernung von Gliomgewebe, die postoperative Strahlentherapie und die Durchführung einer Chemotherapie.

Trotz dieser aggressiven Behandlungsstrategien ist die Prognose der erkrankten Patienten äußerst schlecht, da es in vielen Fällen durch die oben beschriebene Invasion zur Rezidivbildung kommt (Behin et al. 2003).

Daraus leitet sich der Bedarf an innovativen Behandlungsstrategien ab. Grundlage dafür ist jedoch das Verständnis der Tumorbilogie. Wissenschaftliche Ansätze sind daher notwendig, um die Tumorbilogie zu begreifen und um neue Angriffspunkte in der Gliomtherapie zu definieren.

Einen dieser Angriffspunkte könnte das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM darstellen. Es gehört zu den am besten untersuchten Adhäsionsmolekülen im Nervengewebe. Während vor einiger Zeit noch angenommen wurde, dass NCAM nur als einfacher Vermittler der Zell-Adhäsion dient, weiß man inzwischen, dass es auch bei der intrazellulären Signalübertragung eine Rolle spielt und als eine Art Rezeptormolekül fungiert (Crossin und Krushel 2000, Ronn et al. 1998). NCAM kann nicht nur an andere NCAM-Moleküle homophil binden, sondern es interagiert auch mit einer Reihe extrazellulärer Matrixkomponenten und anderen Rezeptormolekülen und tritt mit ihnen in heterophile Wechselwirkungen. Auf diese Weise moduliert es verschiedene biologische Phänomene, einschließlich der zellulären Adhäsion, synaptischen Plastizität, Migration, Proliferation und Differentiation von Neuronen, Gliazellen und neuronalen Stammzellen (Walmod et al. 2004, Kiss et al. 2001).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass NCAM die Proliferation von Astrozyten, hippokampalen Progenitorzellen sowie Gliomzellen der Ratte *in vitro* und zum



Teil *in situ* hemmt (Krushel et al. 1998, Sporns et al. 1995, Amoureux et al. 2000). In der biomedizinischen Fachliteratur gibt es jedoch noch keine veröffentlichten Studien über den Einfluss von NCAM auf die Progression von humanen Gliomen.

Um die Frage zu klären welchen, Einfluss NCAM auf die Progression von humanen Gliomen haben könnte und ob ein Zusammenhang zwischen Malignität und der NCAM-Expression von Gliomen besteht, wurde die Expression einer der Hauptformen von NCAM, der Isoform NCAM-140, mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen humanes NCAM-140 immunhistochemisch an 95 humanen Gliomen unterschiedlicher Histologie und Malignität analysiert. 18 tumorfreie, gesunde Gewebeproben der grauen und weißen Substanz aus 9 Autopsieproben standen für Kontrollwerte zur Verfügung.

Die Intensität der NCAM-140-Immunfärbung, die den Grad der NCAM-140-Expression widerspiegelt, wurde makroskopisch und lichtmikroskopisch bewertet und densitometrisch gemessen. Anschließend wurde mittels Mann-Whitney-Test geprüft, ob die Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den Gliomen sowie den zusätzlich untersuchten Hirntumoren (Metastasen, Meningeome WHO-Grad I, Hypophysenadenome) und der gesunden Hirnsubstanz aus Autopsiegewebe statistisch signifikant sind.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass ein reziproker Zusammenhang zwischen der NCAM-140-Expression und dem WHO-Grad der Gliome besteht. Zum einen konnte festgestellt werden, dass die NCAM-140-Expression mit steigendem WHO-Grad in den jeweiligen Gliomentitäten graduell verloren geht. In der Gruppe der astrozytären Tumore exprimierten die untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV selten NCAM-140; 80% der untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV waren NCAM-140-negativ. Astrozytome WHO-Grad III exprimierten weniger NCAM-140 als die untersuchten Astrozytome WHO-Grad II. Die Expressionsunterschiede sind statistisch signifikant.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die graue Substanz aus tumorfreien Autopsieproben am stärksten NCAM-140 exprimierte. Alle untersuchten Gliome exprimierten signifikant weniger NCAM-140. Die weiße Substanz zeichnete sich im Gegensatz zur grauen Substanz durch eine schwächere NCAM-140-Expression aus.

Weiterhin fiel bei der Auswertung auf, dass NCAM-140-negative Gliome deutlich vom peritumoralen Hirngewebe abgegrenzt werden können. Lichtmikroskopisch konnte sowohl eine diffuse Einzelzell-Invasion als auch eine scharf abgegrenzte Tumorgrenze beobachtet werden.

Darüber hinaus war es auf Grund der unterschiedlichen NCAM-140-Immunreaktivität auch makroskopisch möglich, mit bloßem Auge die Tumorgrenze von NCAM-140-negativen Glioblastomen zum umgebenden peritumoralen Gewebe zu identifizieren. Speziell dieses Ergebnis könnte klinisch während der Operation eines Hirntumors genutzt werden.

Inwieweit NCAM-140 jedoch Einfluss auf die Proliferation sowie Invasion und damit auf die maligne Progression von humanen Gliomen hat, bedarf weiterer Untersuchungen.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Das gesunde Gehirn**

Das Zentrale Nervensystem ermöglicht die Funktionsfähigkeit des Körpers und seine Interaktion mit der Umgebung. Reize der Außenwelt und des Körperinneren, werden von Sinnesorganen wahrgenommen und weiter verarbeitet. Daraufhin sendet das ZNS Impulse zur Körperperipherie, so dass der Organismus auf die sich ständig ändernden Informationen zweckmäßig reagieren kann (Frotscher und Kahle 2000). Es ist das wichtigste Kontroll- und Koordinationssystem des menschlichen Körpers und ist aus Nervengewebe aufgebaut. Das Nervengewebe ist komplex strukturiert und besteht aus den Neuronen, den Gliazellen und den Zellen der Gefäßwände und Hirnhäute. Diese Zellen stehen miteinander in ständiger Verbindung. Informationen werden ausgetauscht, verarbeitet und umgewandelt, um letztlich komplizierte Vorgänge wie Fühlen, Denken, Handeln und Verhalten generieren zu können (Welsch 2003).

### **2.2. Aufbau und Funktion des Zentralen Nervensystems**

Das Zentrale Nervensystem besteht aus Gehirn und Rückenmark. Das Gehirn ist eines der aktivsten Organe des Körpers. Es verbraucht allein einen großen Teil der körpereigenen Glucose, um Adenosintriphosphat (ATP) als Energieträger zu produzieren. 20% des Blutes werden vom Herz durch das Gehirn gepumpt, um die Versorgung sicherzustellen. Wird die Versorgung mit sauerstoffgesättigtem Blut für nur zehn Sekunden unterbrochen, verlieren wir bereits das Bewusstsein. Ein Sauerstoffmangel über diesen Zeitraum hinaus kann zu schweren Hirnschäden führen.

Gehirn und Rückenmark sind von Knochen umgeben. Von den äußeren Liquorräumen und dem Schädelknochen wird es durch die Meningen abgegrenzt. Diese bestehen aus Dura mater, Arachnoidea mater und Pia mater, die dem Hirnparenchym direkt aufliegt.

Die äußeren Liquorräume bilden eine Pufferzone für das Gehirn, um es vor den Folgen mechanischer Einwirkung zu schützen. Die Ventrikel enthalten ebenfalls Liquor cerebrospinalis, der Hormone transportiert und die Ausscheidung von Abfallstoffen ins Blut reguliert. Der Liquor ist wasserklar und besteht hauptsächlich aus Wasser, Natriumchlorid, wenig Protein, Kalium und Glucose. Er wird hauptsächlich in den lateralen, 3. und 4. Ventrikeln gebildet. In der Arachnoidea findet ein Austausch des Liquors mit dem Blut statt (Frotscher und Kahle 2000, Welsch 2003).

Auf den Schnittflächen des Gehirns erkennt man die weiße und die graue Substanz. Bei der grauen Substanz handelt es sich um die Ansammlung von Nervenzellkörpern. Aber auch

Gliazellen finden sich in der grauen Substanz. Die weiße Substanz enthält die Faserbahnen, die aus den zellulären Fortsätzen der Nervenzellen bestehen. In diesen Faserbahnen werden die Qualitäten für motorische, sensorische und vegetative Funktionen übertragen (Frotscher und Kahle 2000).

### **2.3. Aufbau und Funktion der Nervenzelle**

Die Funktionalität des zentralen Nervensystems wird im Wesentlichen durch zwei Zelltypen sichergestellt, den Nervenzellen und den Gliazellen (Trepel 1999).

Nervenzellen leiten Signale in Form von Aktionspotentialen weiter. Ein Neuron besteht aus einem Perikaryon, das den Zellkern enthält und einem oder mehreren Fortsätzen. Diese werden in Dendriten, die dem Erregungsempfang dienen und Axone für die Erregungsweitergabe unterschieden (Trepel 1999). Die Dendriten empfangen den Großteil der ankommenden Erregungen aus der Umgebung durch ihre Synapsen und leiten diese als elektrische Impulse zum Perikaryon weiter (Leonhardt 1990). Ist die Erregung stark genug und überschreitet sie ein Schwellenpotential, so wird im Perikaryon ein Aktionspotential generiert, welches über das Axon weitergeleitet wird und beispielsweise an eine Muskelzelle oder andere Nervenzellen weitergegeben werden kann. Das Axon entspringt am Axonhügel. Um eine optimale, schnelle Erregungsweiterleitung zum Erfolgsorgan zu gewährleisten, sind die Axone im ZNS durch Myelinscheiden umhüllt, welche durch Oligodendrozyten gebildet werden und einer elektrischen Isolation gegenüber der Umgebung dienen. In Abständen ist die Myelinscheide durch Ranviersche Schnürringe unterbrochen, die eine Beschleunigung der Erregungsleitung durch saltatorische Erregungsleitung bedingen (Trepel 1999). Synapsen funktionieren unter anderem durch spezifische Neurotransmitter, zum Beispiel Acetylcholin, Glutamat, Gammaaminobuttersäure oder Dopamin. Elektrische Signale werden in chemische Signale umgewandelt. Man unterscheidet exzitatorische Synapsen und inhibitorische Synapsen.

### **2.4. Funktion und Vorkommen von Gliagewebe**

Auf jede Nervenzelle finden sich im ZNS circa 10 Gliazellen, die für eine regelrechte Funktion der Neurone unentbehrlich sind. Die Gliazellen des ZNS entstehen aus dem Neuralrohr (Trepel 1999) und treten in verschiedenen Differenzierungen auf.

Im ZNS unterscheidet man vier Typen von Gliazellen: die Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und die Mikrogliazellen. Die Mikrogliazellen nehmen dabei

entwicklungsgeschichtlich eine Sonderstellung ein, auf die später eingegangen wird. Die Gliazellen stellen mit etwa 90% den Großteil der Zellen des ZNS (Trepel 1999).

#### *2.4.1. Astrozyten*

Man kann fibrilläre Astrozyten, mit zahlreichen langen Fortsätzen und protoplasmatische Astrozyten mit nur einzelnen Fortsätzen unterscheiden (Trepel 1999). Astrozyten sind reich an Mikrotubuli und Filamenten, deren Hauptbestandteil das fibrilläre, saure Gliaprotein (Glial fibrillar acidic protein = GFAP) ist (Leonhardt 1990). Fibrilläre Astrozyten sind überwiegend in der weißen Substanz des ZNS vorhanden, während protoplasmatische Astrozyten eher in der grauen Substanz des ZNS zu finden sind (Trepel 1999).

Astrozyten sind an Aufbau und Funktion des ZNS unmittelbar beteiligt. Sie gelten als strukturgebende Stütze im ZNS. Nach der Zerstörung von Hirngewebe wird der Defekt durch Proliferation von Astrozyten ersetzt. Es bilden sich Glianarben aus, die unter anderem durch eine deutliche Zunahme des GFAP in den Astrozyten gekennzeichnet sind. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Regulation des Stoffaustauschs zwischen Blutgefäßen und Astrozyten (Frotscher und Kahle 2000). Astrozyten sind dabei integraler Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, die den spezifischen Stofftransfer reguliert (Trepel 1999). Weiterhin beteiligen sich Astrozyten an der Differenzierung von Neuronen während der Embryonalentwicklung, an aktiven Veränderungen des interzellulären Ionenmilieus, an immunologischen Abwehrprozessen des Gehirns und an der Synaptogenese (Trepel 1999).

#### *2.4.2. Oligodendrozyten*

Diese Zellen sind die zentralnervösen Äquivalente der Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems, das heißt sie sind die Markscheidenbildner in der weißen Substanz des ZNS. In der grauen Substanz imponieren sie als Satellitenzellen der Neurone (Leonhardt 1990).

#### *2.4.3. Mikroglia*

Mikrogliazellen sind nicht ortsständig und können durch amöboide Bewegungen im Gewebe wandern. Als ins ZNS eingewanderte Makrophagen dienen sie als Abwehrzellen des ZNS, indem sie unter anderem die Reste von untergegangenen Zellen und andere Pathogene phagozytieren. Sie können Mikroorganismen direkt zerstören und phagozytieren Antigen-Antikörper-Komplexe. Lymphozyten oder Lymphgefäße findet man im ZNS hingegen nicht (Trepel 1999).

#### 2.4.4. Ependymzellen

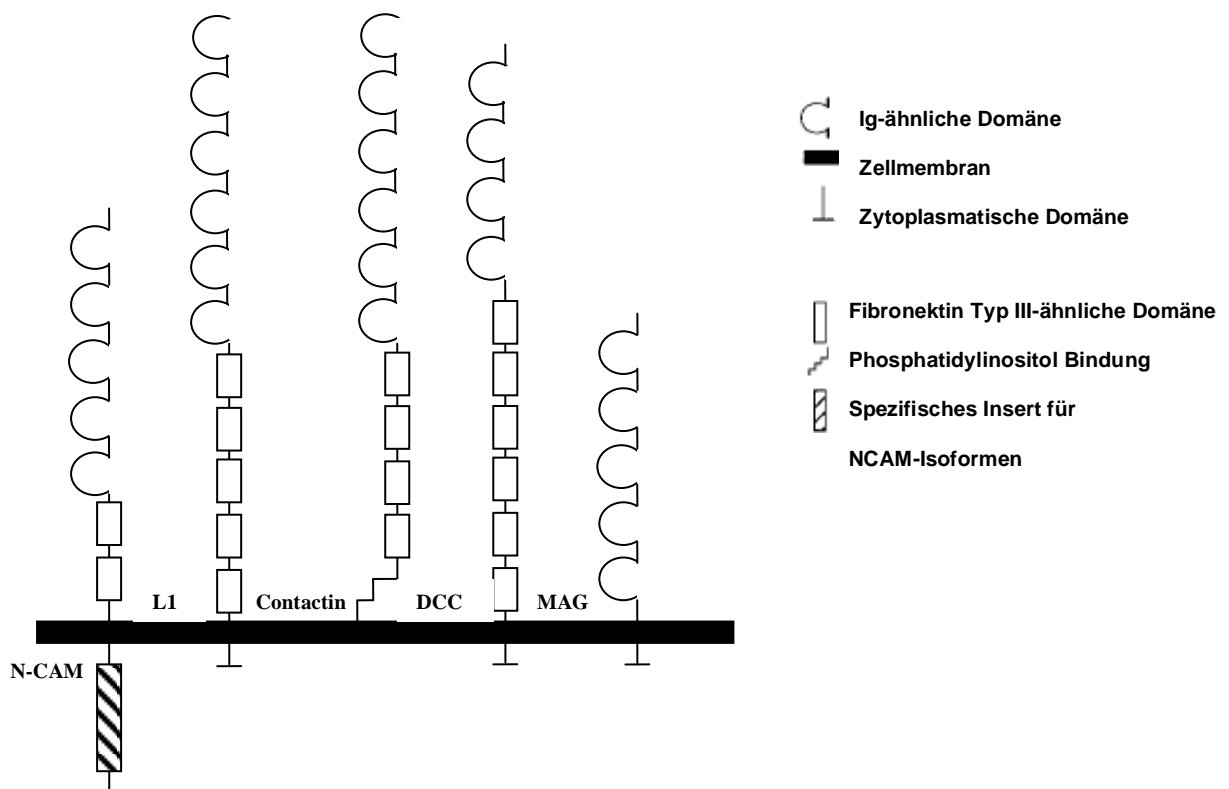
Ependymzellen ähneln hoch prismatischen Epithelzellen. Sie kleiden die inneren Liquorräume aus und schützen das Hirngewebe vor direktem Kontakt zum Liquor. An ihrer Oberfläche tragen sie Kinozilien zum Liquortransport und zahlreiche Mikrovilli, die auf ihre Sekretions- und Resorptionstätigkeit hinweisen (Frotscher und Kahle 2000, Leonhardt 1990).

### 2.5. Das neurale Zelladhäsionsmolekül – NCAM

#### 2.5.1. Struktur und Isoformen

Das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) wurde als erstes Zelladhäsionsmolekül (CAM) intensiv untersucht. Heute zählt es zu den am besten untersuchten CAM-Molekülen und stellt den Prototyp der großen Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle dar. Es ist auch derzeit noch Gegenstand vielseitiger Forschungsansätze.

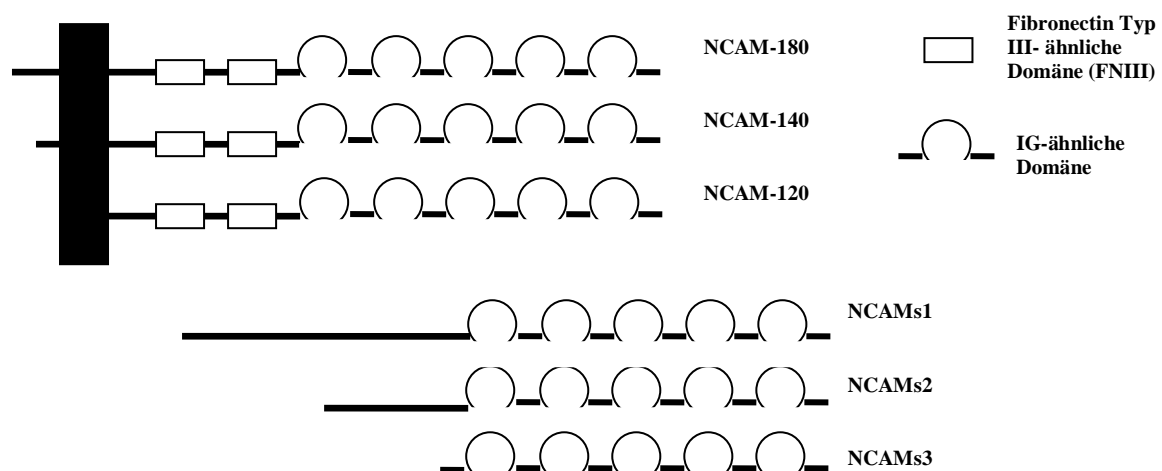
NCAM gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Diese weisen eine ähnliche extrazelluläre Struktur auf und enthalten Fibronectin Typ III-Wiederholungen und Immunglobulin-ähnliche Domänen. Aus der Anordnung der Strukturbausteine und ihrer Funktion ergeben sich mehrere Subfamilien (Crossin und Krushel 2000, Cunningham et al. 1987). Eine schematische Darstellung zeigt die folgende Abbildung.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Subfamilien von Zelladhäsionsmolekülen (modifiziert nach Crossin und Krushel 2000)**

Diese Subfamilien gehören zu der Immunglobulinsuperfamilie und weisen ähnliche Strukturmerkmale auf. Je nach Anordnung ist eine Ig-ähnliche Domäne und eine Fibronectin Typ III-ähnliche Domäne vorhanden, durch diese man die verschiedenen Subfamilien trennen kann.

Zelladhäsionsmoleküle, die aus jeweils zwei Fibronectin-Typ III-Wiederholungen gefolgt von fünf Ig-ähnlichen Domänen bestehen, werden in die NCAM-5/2-Subfamilie eingeordnet (Crossin und Krushel 2000, Cunningham et al. 1987). Durch alternatives mRNA-Splicing des kodierenden Gens für NCAM konnten bisher über 30 verschiedene Isoformen dieser Subfamilie isoliert werden. Die am häufigsten vorkommenden Formen sind zwei transmembranöse Isoformen mit einem Molekulargewicht von 140 kDa (NCAM-140) und 180 kDa (NCAM-180) und eine dritte mit 120 kDa (NCAM-120), die mittels eines Glycophosphatidylrests in der Zellmembran verankert ist (Crossin und Krushel 2000, Owens et al. 1987). Diese Formen haben ein vergleichbar niedriges Molekulargewicht und sind vor allem im ausgereiften Nervensystem vorhanden. Formen mit höherem Molekulargewicht (200-300 kDa) findet man vor allem in der embryonalen Phase der Entwicklung des ZNS (DiFiglia et al. 1989). Das Molekulargewicht hängt dabei von der Länge des C-terminalen Endes ab (Crossin und Krushel 2000, Ronn et al. 1998). In der folgenden Abbildung 2 sind die verschiedenen Isoformen mit ihrem Molekulargewicht dargestellt.



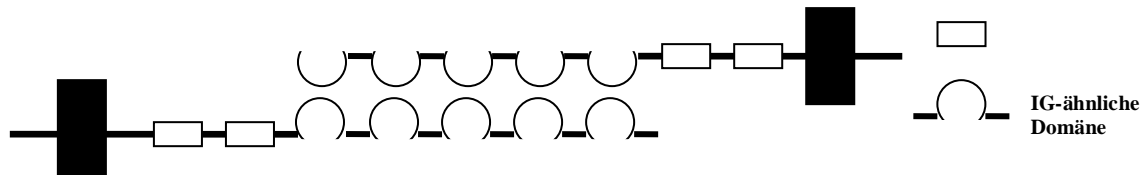
**Abbildung 2: Die bekanntesten NCAM-Isoformen (modifiziert nach Ronn et al. 1998)**

NCAM-180 (180 kDa) und NCAM-140 (140 kDa) sind transmembränös mit der Zelle verbunden, NCAM-120 (120 kDa) über einen Glykophosphatrest. Alle Isoformen besitzen unterschiedlich intrazelluläre lange C-Termini und können auch als lösliche Form vorkommen (NCAMs).

### 2.5.2. Bindungsverhalten und die Bedeutung bei Zell-Zell-Kontakten

Viele Ig-ähnliche Zelladhäsionsmoleküle verfügen über die Fähigkeit, mit identischen Adhäsionsmolekülen oder anderen Molekülen eine Bindung einzugehen. Befinden sich beide Moleküle nicht in der löslichen Form, sondern werden auf Zelloberflächen exprimiert, kann dadurch eine Zell-Zell-Interaktion erreicht werden, die die weiteren Prozesse der Zelle entscheidend beeinflussen kann. Durch diese Zell-Zell-Interaktion werden Prozesse wie Invasion, Migration, und Proliferation maßgeblich mitbestimmt. Man unterscheidet homophile und heterophile Bindungen von NCAM mit seinen Partnern. Wird ein Kontakt

zwischen zwei Zellen hergestellt, in dem ein Zelladhäsionsmolekül einer Zelle mit einem identischen Zelladhäsionsmolekül einer anderen Zelle interagiert, spricht man von einer homophilen Bindung. Dabei treten alle Ig-ähnlichen Domänen miteinander in Kontakt, so dass eine antiparallele Bindung entsteht (Crossin und Krushel 2000, Ronn et al. 1998, Walmod et al. 2004) wie in Abbildung 3 gezeigt wird.



**Abbildung 3: Homophile Bindung zweier NCAM- Moleküle (modifiziert nach Ronn et al. 1998)**

Bei der homophilen Bindung zweier CAM Moleküle interagieren alle Ig- ähnlichen Domänen beider Moleküle miteinander, so dass eine antiparallele Bindung entsteht, die zur festen Verzahnung der CAM Moleküle und somit auch der Zellen führt.

Zelladhäsionsmoleküle sind jedoch nicht nur auf identische Bindungspartner angewiesen. Durch die Bindung sind multiple Interaktionen mit verschiedensten Bindungspartnern möglich (Crossin und Krushel 2000). Eine steigende Zahl an Zelladhäsionsmolekülen hat außerdem die Fähigkeit erworben mit anderen Bindungspartnern in Kontakt zu treten, welche nicht zur Familie der immunglobulinähnlichen Zelladhäsionsmoleküle gehören. Dazu zählen extrazelluläre Matrixbestandteile wie Laminine, Integrine und Adenosintriphosphat (ATP). Über diese Interaktionsebenen können Neurone und Gliazellen miteinander und untereinander kommunizieren (Ronn et al. 1998, Walmod et al. 2004).

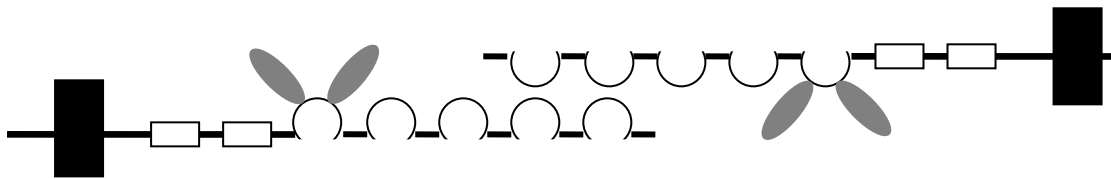
### *2.5.3. Entstehung des polysialysierten NCAM (PSA-NCAM), Vorkommen und Funktion*

Man weiß inzwischen, das NCAM nicht nur auf Neuronen sondern auf vielen anderen Körperzellen vorkommt. In der embryonalen Phase findet man das so genannte emryonic-NCAM (E-NCAM). Diese hoch sialysierte Form konnte vor allem auf Neuronen und Gliazellen, im Striatum, im Thalamus, im Limbischen System, in der Amygdala und im Hippocampus nachgewiesen werden (Le Gal La Salle et al. 1992). Man nennt es auch PSA-NCAM. PSA-NCAM hat wichtige Funktionen bei der Differenzierung von Zellen, der begrenzten Proliferation verschiedener Zelltypen und der Migration von Zellverbänden oder einzelnen Zellen. In der weiteren Entwicklung verändert PSA-NCAM seine Form und Struktur auf der Zelloberfläche. Es entstehen die adulten NCAM-Formen, wie NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120 (Le Gal La Salle et al. 1992, Doherty et al. 1990). Diese können durch Interaktionen mit anderen Bindungspartnern ein intrazelluläres Signal auslösen, das zu Veränderungen der Genexpression führt. Dadurch kann NCAM auch im ausgereiften Nervensystem einen Einfluss auf die Migration, Differenzierung, Proliferation und Invasion



von Neuronen und Gliazellen haben. Es kann aber auch die eigene Expression auf der Zelloberfläche beeinflussen (Crossin und Krushel 2000, Ronn et al. 1998).

NCAM kann als einziges neurales Zelladhäsionsmolekül durch Anhängen eines großen, negativ geladenen Zuckermoleküls, der so genannten Polysialylsäure (PSA), modifiziert werden. Die absolute Menge dieses PSA-Rests pro 100g NCAM-Protein vermindert sich jedoch im Laufe der Entwicklung von 30g im embryonalen Gehirn auf 10g im erwachsenen Gehirn. Die Anwesenheit von PSA verändert die Kinetik der homophilen Bindung des NCAM-Moleküls. Bei der homophilen NCAM-Bindung treten alle Ig-Domänen der beiden NCAM-Moleküle antiparallel in Kontakt (Crossin und Krushel 2000). Der PSA-Rest kann die Interaktion so beeinflussen, dass lediglich die erste und zweite Ig-Domäne eine Bindung miteinander eingehen und die Bindung dadurch „lockerer“ gestaltet wird. (siehe Abbildung 5). Dadurch wirken geringere Adhäsionskräfte und die Bindung bleibt flexibler (Walmod et al. 2004, Storms und Rutishauser 1998).



**Abbildung 4: PSA - NCAM (modifiziert nach Ronn et al. 1998)**

Durch das Anhängen von PSA an die 5. Ig-Domäne des NCAM-Moleküls wird die homophile Interaktion von zwei NCAM-Molekülen so beeinflusst, dass nur die ersten zwei Ig-Domänen eine Bindung eingehen. PSA-NCAM ist somit durch eine lockere Zelladhäsion charakterisiert. Es kommt bei allen Prozessen der embryonalen Proliferation und Migration vor, aber auch im adulten Gehirn in Arealen erhöhter zellulärer Plastizität. Ziel der lockeren Zelladhäsion ist eine zügige Herauslösung der Zellen aus dem Verband im Rahmen plastischer Vorgänge.

Damit ist die Grundlage für Modulationsprozesse im Neokortex, im Limbischen System oder der Amygdala gegeben (Ronn et al. 1998, Kiss et al. 2001). Durch neue synaptische Verbindungen können Modulationen des Kurz – und Langzeitgedächtnisses erfolgen oder es kann die Größe von Rindenfeldern nach Verletzung variieren und auch neu adaptiert werden (Kiss et al. 2001).

#### *2.5.4. In situ-und in vitro-Studien über die Expression von NCAM*

NCAM spielt eine weit größere Rolle als bisher angenommen. Neuere Publikationen zeigten eine Vielfalt von Interaktionen mit anderen Zellen und Zellverbänden, die über NCAM ablaufen (Tonn et al. 2003, Cavallaro et al. 2004, Todaro et al. 2007). Die Eigenschaft, sich Veränderungen in der Umgebung anzupassen und aktiv an Prozessen wie der Remodelierung

von verletztem Gewebe mitzuwirken ist eine von vielen weiteren Möglichkeiten dieser Moleküle und Bestandteil intensiver Forschung (Sporns et al. 1995).

Nach einer penetrierenden Verletzung im ZNS bilden Astrozyten eine Glianarbe durch Hypertrophie mit gesteigerter Expression von GFAP aus. Es bildet sich eine Glianarbe. Diese Gliaproliferation wird zellulär streng kontrolliert (Krushel et al. 1998, McMillan et al. 1994). Auf den Astrozyten fand man neben Adhäsionsmolekülen wie L1 und Laminin auch NCAM, dessen Expression nach Läsionen des Hirngewebes und Zellverbänden deutlich anstieg (Sporns et al. 1995, Edelman 1986, Cunningham et al. 1987). Nach Stimulation von Rattenastrozyten mit löslichem NCAM in vitro und in situ und einem synthetisierten NCAM-ähnlichen Peptid (mit korrespondierender Bindungssequenz zur dritten Ig-ähnlichen Domäne von NCAM) zeigte sich eine Inhibition der Proliferation bis zum Proliferationsstop, ohne dass eine Apoptose oder Zellnekrose auftrat (Crossin et al. 1997).

Da die synthetische dritte Ig-ähnliche Domäne von NCAM den gleichen inhibitorischen Effekt wie das lösliche NCAM zeigte, wurde die Vermutung geäußert, dass an der Kontrolle der Gliazellproliferation NCAM mit einer homophilen Bindung beteiligt ist. Zur Realisierung dieses inhibitorischen Effekts wird unter anderem der Glukokortikoid-Rezeptor-Signaltransduktionsweg benutzt (Krushel et al. 1998). Es zeigte sich, dass Dexamethason, Cortikosteron und Aldosteron hemmend auf die Gliazellproliferation wirken. Der Effekt nach Zugabe des Glukokortikoidantagonisten RU-486 jedoch ausblieb. Das Ausmaß der Inhibition war dabei maßgeblich von der Zelldichte abhängig. Eine maximale Inhibition zeigte sich bei niedriger Zelldichte und hoher Proliferation. Hingegen bei konfluenten Zellen mit niedriger Proliferationsrate war die Inhibition eher gering ausgeprägt (Krushel et al. 1998, Crossin et al. 1997).

Insgesamt erhärteten die erhöhten Expressionswerte von NCAM nach Verletzung von neuronalen und glialen Gewebeverbänden und die Präsenz von NCAM auf reaktiven Astrozyten die Vermutung, dass Zelladhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle in Regenerations- und Remodelierungsprozessen des ZNS spielen könnten (Krushel et al. 1998, Sporns et al. 1995, Amoureux et al. 2000).

Darüber hinaus ist aus Experimenten mit Ratten und Hühnern bekannt, dass NCAM einen entscheidenden Einfluss auf Lern- und Denkprozesse haben kann (Welzl und Stork 2003).

Die Gestaltung des Gedächtnisses basiert auf der Verknüpfung von spezifischen Synapsen und der Förderung der Übertragungsgeschwindigkeit von Impulsen. Gespeicherte Informationen des Kurzzeitgedächtnisses gehen durch den Prozess der Konsolidierung in das Langzeitgedächtnis über. Es wird vermutet, dass Zelladhäsionsmoleküle in diesem Prozess aktiv mitwirken, besonders bei synaptischen Veränderungen während der Konsolidierung (Welzl und Stork 2003). Bei Zugabe von Antikörpern, die die Funktion von L1 und NCAM-180 blockierten, zeigte sich eine starke Beeinträchtigung dieses Konsolidierungsprozesses bei Hühnern und Ratten (Rose 1995, Welzl und Stork 2003). Weiterhin konnte man bei Ratten, die intensiven Lernprozessen unterzogen wurden, einen deutlichen Expressionsanstieg von NCAM-180 nachweisen (O'Connell et al. 1997). Diese Daten erhärteten die Hypothese, dass NCAM-180 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Ausreifung des Gedächtnisses spielen kann (Connell et al. 1997, Amoureux et al. 2000).

Letztlich konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung von Ratten-Astrozyten und Neuronen zu einer Reduktion der astrozytären Proliferation führt, im Gegensatz zu Astrozyten-Kontroll-Kulturen ohne Kokultivierung mit Neuronen (Sporns et al. 1995). In Abwesenheit von Neuronen konnte eine starke Proliferation der Gliazellen beobachtet werden, während bei ihrer Anwesenheit eine Verlangsamung der Proliferation auftrat und sich die Gliazellen differenzierten und letztlich die Migration von Neuronen weniger inhibiert wurde (Hatten 1987).

## **2.6. Kaskade des autonomen Zellwachstums**

Die meisten Tumore entwickeln sich durch die Zellteilung einer Mutterzelle - also monoklonal. In Tumorzellen können somatische Mutationen, Amplifikationen von Protoonkogenen oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen auftreten (Cervos-Navarro und Ferszt 1989). Sobald ein Baustein aus dem chromosomalen Gefüge heraus gebrochen ist, folgen weitere Verluste von zellregulatorischen Informationen. Die Begriffe Tumor, Geschwulst, Neoplasie können synonym verwendet werden, sagen aber nichts über die biologische Dignität eines Tumors aus. Diesbezüglich unterscheidet man benigne und maligne Tumoren (Schäfer und Riede 2001, Okazaki 1983).

### *2.6.1. Neoplastische Läsionen des Zentralnervensystems*

Die Ursachen menschlicher Hirntumore sind noch weitgehend unbekannt. Für eine virale oder chemische Karzinogenese gibt es keine sicheren Hinweise. Für einige Hirntumoren, vor allem

solche, die im Rahmen von so genannten neurokutanen Fehlbildungssyndromen auftreten, sind genetische Läsionen gesichert (Schäfer und Riede 2001).

Darüber hinaus sind zerebrale Zweittumore nach Schädelbestrahlung bekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass bestimmte Rezeptoren, zum Beispiel der EGF-Rezeptor sowie Defekte von Tumorsuppressorgen in die Tumorgenese des Nervensystems involviert sind (Schäfer und Riede 2001).

Aufgrund der geringen Raumreserve innerhalb der Schädelhöhle führt jeder intrakranielle Tumor, wenn er eine kritische Größe erreicht hat, zu einer lebensbedrohlichen Hirndrucksteigerung. Die in der allgemeinen Tumorpathologie gültigen Malignitätskriterien des TNM-Systems lassen sich deshalb in der Neuroonkologie nur beschränkt anwenden. Hirneigene Tumore zeichnen sich durch ihre extrem seltene Fernmetastasierung und ihre ausgeprägte Invasivität in das Hirngewebe aus (Cervos - Navarro und Ferszt 1989).

#### *2.6.1.1. WHO-Klassifikation*

Da intrakranielle Tumore von dem allgemeinen Schema der sonst im Körper wachsenden Tumore mehr oder weniger stark abweichen, wurde eine eigene Klassifizierung notwendig. Nachdem Cushing und Bailey die erste Klassifikation der intrakraniellen Tumoren vornahmen, wurde 1979 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine allgemein gültige Klassifikation der intrakraniellen Tumoren verabschiedet, die sich am histologischen Aufbau der einzelnen Geschwülste orientiert (Schirmer 2005, Kleihues und Cavenee 2000).

In der aktualisierten WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2000 werden folgende morphologische Parameter zur Gradierung der Hirntumore herangezogen: Ausmaß der zellulären Differenzierung, zelluläre und nukleäre Polymorphie, Tumorzelldichte, mitotische Aktivität, Endothelproliferate und das Vorhandensein von Tumorgewebsnekrosen (Schlegel et al. 2003, Kleinig und Sitte 1999, Kleihues und Cavenee 2000).

Die WHO-Klassifikation schlägt auf dieser Grundlage eine vierstufige Gradierungsskala mit den WHO-Graden I bis IV für ZNS-Tumore vor. Die Prognose verschlechtert sich mit steigendem Grad (Schirmer 2005, Kleihues und Cavenee 2000). Die nachfolgende Übersicht nennt die wesentlichen Charakteristika der einzelnen WHO-Grade.

- WHO-Grad I:* Geringe Zelldichte mit gleichförmigen Zellen ohne atypische Mitosen, keine Endothelproliferate. Es handelt sich um langsam, meist gut abgegrenzt wachsende Hirntumore.
- WHO-Grad II:* Geringe bis mäßige Zelldichte, geringe Zell- und Kernatypien, keine Gewebnekrosen, keine Endothelproliferate. Es handelt sich um langsam aber in das umgebende Gewebe infiltrierend wachsende Hirntumore.
- WHO-Grad III:* Höhere Zelldichte mit mäßiger bis starker Zell- und Kernpolymorphie und zahlreichen, teilweise auch atypischen Mitosen. Endothelproliferate sind möglich. Es handelt sich um rasch und diffus infiltrierend wachsende Hirntumore.
- WHO-Grad IV:* Hohe, zum Teil wechselnde Zelldichte mit starken Zell- und Kernpolymorphismen, zahlreichen atypischen Mitosen und ausgedehnten Nekrosen sowie Endothelproliferaten. Es handelt sich um sehr rasch und diffus infiltrierend wachsende Hirntumore.

#### *2.6.2. Humane Gliome*

Gliome sind Tumore, die vom neuroepithelialen Gewebe ausgehen. Sie können den Phänotyp von Gliazellen widerspiegeln. Dementsprechend bezeichnet man sie als Astrozytome, Oligodendrogliome, Mischgliome (unter anderem Oligoastrozytome) und Ependymome. Kann man keine phänotypischen Merkmale von Gliazellen identifizieren, liegt meist das bösartigste aller Gliome, das so genannte multiforme Glioblastom vor, welches in die Gruppe der Astrozytome eingeordnet wird (Schäfer und Riede 2001, Kleihues und Cavenee 2000). Man vermutet, dass sowohl neurale als auch gliale Vorläuferzellen und ausgereifte Gliazellen Ursprungszellen von Gliomen sein können (Schäfer und Riede 2001). Dabei machen die Gliome mehr als die Hälfte aller neuroepithelialen Tumore aus (Cervos-Navarro und Ferszt 1989). Außer den Gliomen zählen weiterhin neuronale Tumore (zum Beispiel Gangliozytome, Gangliogliome) und Tumore aus ZNS-Vorläuferzellen (zum Beispiel Medulloepitheliom, primitiver neuroektodermaler Tumor, Medulloblastome) zu den neuroepithelialen Hirneoplasien (Schäfer und Riede 2001, Okazaki 1983).

### *2.6.2.1. Astrozytome*

Man vermutet, dass sich diese Tumore von Astrozyten ableiten. Sie kommen in mehreren Subtypen mit unterschiedlichen histologischen Wachstumsmustern und unterschiedlicher biologischer Wertigkeit vor. Astrozytome gehören zu den häufigsten ZNS-Tumoren. Sie treten vor allem im Kindesalter und in der 4.-5. Lebensdekade auf, wobei sie je nach Manifestationsalter unterschiedliche Prädilektionsstellen aufweisen (Cervos-Navarro und Ferszt 1989).

Astrozytome sind meist diffus infiltrierende, unscharf begrenzte Tumore mit zum Teil mikrozystischer Degeneration. Anhand der WHO-Klassifikation unterscheidet man vier WHO-Grade dieser ZNS-Tumoren. Zum WHO-Grad I zählt das pilozytische Astrozytom, welches im Gegensatz zu den anderen astrozytären Tumoren meistens nur im Kindes- und Jugendalter vorkommt und häufig im Bereich des Kleinhirns und des Hirnstamms wächst. Als WHO-Grad II werden das fibrilläre Astrozytom, das protoplasmatische sowie das gemistozytische Astrozytom eingeteilt. Anaplastische Astrozytome werden als Grad-III-Tumore nach WHO eingeteilt. Vertreter dieser Gruppe kommen meist im mittleren Erwachsenenalter (30.-45. Lebensjahr) vor und sind bevorzugt in den Großhirnhemisphären lokalisiert (Schäfer und Riede 2001).

Tumore des WHO-Grades IV sind zum Beispiel das Glioblastom und das Gliosarkom (Cervos-Navarro und Ferszt 1989, Okazaki 1983). Grad-IV-Tumore nach WHO werden unter 2.6.2.1.1. eingehender charakterisiert.

#### *2.6.2.1.1. Glioblastoma multiforme*

Das Glioblastom ist der bösartigste und häufigste astrozytäre Tumor (Grad IV) mit dem höchsten Anaplasiegrad. Man unterscheidet dabei primäre und sekundäre Glioblastome. Primäre Glioblastome sind bei Erstdiagnose bereits WHO-Grad-IV-Tumore, während sekundäre Glioblastome als Rezidivgliom eines höher differenzierten Astrozytoms geringeren WHO-Grades entstehen. Glioblastome kommen gehäuft ab dem 45. Lebensjahr vor und können oft auch multifokal auftreten (Schäfer und Riede 2001). Sie sind vor allem in den Großhirnhemisphären lokalisiert und breiten sich bevorzugt entlang der myelinisierten Fasertrakte auf die Gegenseite aus (Schäfer und Riede 2001). Daher stammt auch die Bezeichnung "Schmetterlingsgliom". Die Tumorschnittfläche ist charakteristischerweise durch Nekrosen und Hämorrhagien gekennzeichnet und weist daher ein buntes Bild auf, was sich in dem Namenszusatz "multiform" äußert.

Histologisch ist der rasch wachsende Tumor sehr zell dicht aufgebaut und besteht aus entdifferenzierten Tumorzellen, die groteske Riesenformen annehmen können. Typisch sind auch ausgeprägte Gefäßproliferate sowie flächenhafte Nekrosen (Kleihues und Cavenee 2000). Trotz kombinierter Chemo- und Strahlentherapie nach erfolgter Operation ist die Prognose sehr schlecht. Die postoperative Überlebenszeit betrug durchschnittlich 6 Monate, wobei durch das Chemotherapeutikum Temozolamid derzeit maximale Überlebenszeiten von circa 24 Monaten erreicht werden können (Schäfer und Riede 2001, Dehdashti et al. 2006).

#### *2.6.2.2. Oligodendrogliome*

Die Oligodendrogliome bilden nach den WHO-Kriterien eine eigene Hirntumorgruppe. Ihre Tumorzellen ähneln Oligodendrozyten, die aber keine bisher bekannten Oligodendrozytenmarker exprimieren (Kleihues und Cavenee 2000). Sie entstehen vorwiegend in den Großhirnhemisphären und kommen gehäuft in der 4.-5. Lebensdekade vor. Etwa 5% aller neuroepithelialen Tumore sind Oligodendrogliome. Die Tumorzellen der Oligodendrogliome zeigen zumeist mikroskopisch rundliche, chromatinreiche Kerne, ein klares Cytoplasma und eine scharf abgegrenzte Zellmembran. Sie verleiht dem Tumor eine typische „Honigwaben“-Architektur. Dieses Merkmal kommt dadurch zustande, dass das myelinhaltige Cytoplasma der Oligodendrogliomzellen bei der histopathologischen Aufarbeitung durch Lösungsmittel entfernt wird (Schlegel et al. 2003, Kleihues und Cavenee 2000). Oligodendrogliome neigen zu regressiven Veränderungen in Form von Blutungen, Zysten und Verkalkungen (Schäfer und Riede 2001). Die WHO-Klassifikation unterscheidet Oligodendrogliome (WHO-Grad II) und deren anaplastische Variante, die dem WHO-Grad III zugeordnet wird.

#### *2.6.2.3. Mischgliome*

Darüber hinaus bilden auch die Mischgliome eine eigene Tumorgruppe. Wir kennen die so genannten Oligoastrozytome (WHO-Grad II) und ihre anaplastische Variante vom WHO-Grad III. Das Oligoastrozytom wird durch eine auffällige Mischung von zwei unterschiedlichen Tumorzellpopulationen mit astrozytärem und oligodendroglialem Phänotyp charakterisiert. Diese unterschiedlichen Tumorzellpopulationen können räumlich getrennt in verschiedenen Tumorabschnitten vorkommen oder diffus miteinander vermischt sein (Schlegel et al. 2003).

#### *2.6.2.4. Ependymome*

Ependymome sind Tumore, die sich von den Zellen des Ventrikelependyms herleiten. Da die Ependymzellen die liquorgefüllten Hohlräume des zentralen Nervensystems auskleiden, treten die Ependymome gehäuft im Bereich der Hirnventrikel und manchmal auch im Spinalkanal auf. Supratentorielle Ependymome bevorzugen keine bestimmte Altersgruppe, während sich die infratentoriellen Ependymome vorwiegend im Kindesalter manifestieren. Ependymome machen beim Erwachsenen etwa 5% aller neuroepithelialen Tumore aus. Bei Kindern sind sie nach Astrozytomen und Medulloblastomen der dritthäufigste Tumortyp (Schäfer und Riede 2001). Die WHO unterscheidet das niedriggradige Subependymom (WHO-Grad I), das Ependymom (WHO-Grad II) und das anaplastische Ependymom (WHO-Grad III) (Schlegel et al. 2003).

#### *2.6.3. Humane Meningeome*

Diese meist gutartigen Tumore (meist WHO-Grad I) entstehen aus den Arachnoidalzellen der Meningen. Sie gehören mit etwa 25% der ZNS-Tumoren zu den häufigsten intrakraniellen Neoplasien des Erwachsenenalters und stellen die zweithäufigsten Tumore im Spinalkanal dar. Sie treten meist ab der 5. Lebensdekade auf. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (Schäfer und Riede 2001). Die Prognose ist nach chirurgischer Resektion des Tumors günstig, da es sich in den meisten Fällen um gutartige Neoplasien handelt, die nicht das Hirnparenchym infiltrieren (Schäfer und Riede 2001).

Meningeome wölben das innere Durablatt gegen das Gehirn vor. Gelegentlich können Meningeome aber auch diffus fächerförmig wachsen und bilden dann das so genannte Meningeom en plaque (Schäfer und Riede 2001), welches insbesondere im Bereich des Keilbeinflügels beobachtet werden kann. Makroskopisch imponieren sie als derbe Tumore mit grauer körniger Schnittfläche.

#### *2.6.4. Hypophysenadenome*

Hypophysenadenome zählen zu den häufigsten neoplastischen Läsionen der Sellaregion und bilden etwa 10% aller intrakraniellen Tumore (Schirmer 2005). Sie differenzieren sich aus den endokrinen Zellen der Adenohypophyse und sind überwiegend gutartig. Produziert der Tumor ein einziges Hormon, so spricht man von monohormonalen Adenomen und bei der Produktion von mehr als zwei Hormonen von polyhormonalen Adenomen. Je nach Hormontyp unterscheidet man ein Prolaktin-bildendes Adenom, ein Wachstumshormon-bildendes Adenom und ein ACTH-bildendes Adenom. Makroskopisch wachsen sie zunächst



expansiv und verdrängen das restliche Drüsengewebe an den Rand. Eine eigene Bindegewebskapsel haben sie nicht. Auf der Schnittfläche neigen sie zu regressiven Veränderungen, wie Hämorrhagien und Fibrosierungen. Neben den hormonaktiven Mikroadenomen unterscheidet man die hormoninaktiven Makroadenome, die durch neurologische Ausfälle, wie die typische homonyme Hemianopsie, klinisch manifest werden (Schäfer und Riede 2001).

#### *2.6.5 Hirnmetastasen*

Tumormetastasierung im engeren Sinne, fasst alle diejenigen Prozesse zusammen, die an der Verschleppung maligner Zellen beteiligt sind und ihr An- und Weiterwachsen in entfernteren Körperregionen ermöglichen. Da von den meisten malignen Prozessen Metastasen ausgehen, gilt die Metastasierungsfähigkeit eines Tumors als eindeutiges Malignitätskriterium. Dieser Vorgang ist ausgesprochen selektiv, denn von den Millionen Zellen, die von einem Tumor abwandern, führen nur einige wenige zu einer Metastase. Tumorzellen können sich lymphogen, hämatogen oder kavitär entlang vorbestehender Höhlen oder per continuitatem absiedeln. Die Metastasierungswege ins gesunde Gehirn erfolgen meist auf dem hämatogenen Weg. Im Gegensatz zu den meisten extrakraniellen Tumoren, ist eine Metastasierung von Neoplasien des Gehirns, wie zum Beispiel Gliomen äußerst selten. Nur in einigen Fällen, vor allem bei hochmalignen Tumoren kann eine kavitäre Metastasierung entlang des Spinalkanals erfolgen. (Schäfer und Riede 2001). Diese Metastasen sind dann unter dem Namen Abtropfmetastasen bekannt.

Etwa 30-40% der operierten intrakraniellen Tumore sind Metastasen von Karzinomen aus anderen Körperregionen (Schirmer 2005). Das Bronchialkarzinom metastasiert bevorzugt in das Gehirn, aber auch alle anderen malignen Neoplasien können intrakranielle Metastasen absiedeln. Eine weitere häufige Metastasierung kommt beim malignen Melanom vor (Schirmer 2005, Lantuejoul et al. 1998). Metastasen sind zu 80% supratentoriell und zu 20% infratentoriell lokalisiert (Poeck und Werner 2001). Sie finden sich meist an der Rindenmarkgrenze. Initial sind sie meist noch gut vom Hirngewebe abgegrenzt und von einem deutlichen Ödem umgeben, später wachsen sie auch infiltrierend. In 25% der Fälle gehen Hirnmetastasen von einem Bronchialkarzinom aus (Poeck und Werner 2001). Dieses ist oft zum Zeitpunkt der Metastasierung noch so klein, dass es selbst im Thorax-Computertomogramm nicht nachzuweisen ist. Hierbei am häufigsten ist das Adenokarzinom. Bei einem Viertel der Fälle liegen kleinzellige Karzinome vor. Adenokarzinommetastasen haben eine bessere Therapieaussicht. Remissionen lassen sich bei diesem Typ von Karzinom

bei der Mehrzahl der Patienten erzielen. Mammakarzinome metastasieren vor allem multipel in das Gehirn und Rückenmark. Sie neigen zur Menigeose. Operation und Ganzhirnbestrahlung sind die therapeutischen Optionen, da Chemotherapie zu keiner signifikanten Besserung der Prognose führt (Poeck und Werner 2001). Beim malignen Melanom liegen oft Jahr zwischen der Operation des Melanoms und dem Auftreten der Hirnmetastasierung. Die Metastasen wachsen sehr schnell und werden mit Anfällen, Lähmungen und Verlangsamung symptomatisch. Melanommetastasen neigen zur Einblutung, zu multipler Lokalisation und zur Beteiligung der Hirnhäute. Die Therapie der Wahl besteht in der radikalen Operation und einer Nachbestrahlung. Bei Nierenzellkarzinom kann es selbst nach mehr als einem Jahrzehnt nach der Operation zu Hirnmetastasen kommen (Poeck und Werner 2001).

### 3. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM-140 hat möglicherweise eine Bedeutung für die maligne Progression von humanen Hirntumoren. Der Anstoß für diese Hypothese leitet sich aus *in vitro*- sowie *in situ*-Studien ab, in denen festgestellt wurde, dass NCAM-140 die Proliferation (Krushel et al. 1995, Sporns et al. 1995) sowie Differenzierung (Hatten 1987) von Rattenastrozyten, Neuronen und Rattengliomzellen beeinflusst.

Es soll nun untersucht werden, in welchem Umfang die Isoform 140 des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM-140) auf humanen Hirntumorzellen exprimiert wird, um in späteren Experimenten dieses NCAM-140 zu stimulieren oder zu hemmen und den Effekt auf das Tumorwachstum zu beobachten.

Des Weiteren soll ermittelt werden, ob sich eine reproduzierbare Gesetzmäßigkeit zwischen dem NCAM-Expressionsstatus und dem WHO-Grad der humanen Hirntumore feststellen lässt.

Um diese Fragestellung zu klären, sollen humane Hirntumore unterschiedlicher Histologie und Malignität (WHO-Grad I bis IV) und andere intrakranielle Tumore (Metastasen, Meningeome, Hypophysenadenome) aus dem Operationsmaterial von Patienten der Klinik für Neurochirurgie an der Universität Jena immunhistochemisch untersucht werden. Autopsieproben gelten als Kontrollen.

Der NCAM-140-Expressionsstatus wird in drei Schritten erfasst: makroskopisch, mikroskopisch und densitometrisch.

Die gewonnenen Ergebnisse sollen letztlich in Bezug auf ihre biologische Wertigkeit und ihre klinische Nutzbarkeit analysiert und diskutiert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Materialien und Geräte

#### 4.1.1. Gewebeproben

Für die Untersuchung wurden alle verfügbaren Gliompräparate der Jahre 1998-2003 aus dem pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität verwendet. Darüber hinaus wurden weitere Tumorpräparate (Meningeome, Metastasen etc.) aus den Jahren 2002-2003 verwendet. Ein entsprechender Antrag zur Untersuchung dieser Gewebe wurde bei der Ethikkommission gestellt und bewilligt. Bei der Gewebeuntersuchung wurden die genehmigten Verfahren angewendet.

Probe	Anzahl	Herkunft
<i>Gliome</i>		
Glioblastom WHO-Grad IV	48	Operationsmaterial
(mit sichtbarer Grenze zum peritumoralen Hirngewebe)	25	Operationsmaterial
(ohne sichtbare Grenze zum peritumoralen Hirngewebe)	23	Operationsmaterial
Astrozytom WHO-Grad III	15	Operationsmaterial
Astrozytom WHO-Grad II	16	Operationsmaterial
Astrozytom WHO-Grad I	4	Operationsmaterial
Oligoastrozytom WHO-Grad III	2	Operationsmaterial
Oligoastrozytom WHO-Grad II	2	Operationsmaterial
Oligodendrogliom WHO-Grad III	1	Operationsmaterial
Oligodendrogliom WHO-Grad II	3	Operationsmaterial
Ependymom WHO-Grad II	3	Operationsmaterial
Ependymom WHO-Grad I	1	Operationsmaterial
	-----	
Summe	115	
<i>Metastasen</i>		
Kolonkarzinom	2	Operationsmaterial
Mammakarzinom	1	Operationsmaterial
Urothelkarzinom	1	Operationsmaterial
Bronchialkarzinom	1	Operationsmaterial
Nierenzellkarzinom	1	Operationsmaterial
Plasmozytom	1	Operationsmaterial
	-----	
Summe	7	
<i>Sonstige intrakranielle Tumore</i>		
Meningeom WHO-Grad I	7	Operationsmaterial
Hypophysenadenom	4	Operationsmaterial
Pineozytom	1	Operationsmaterial
Neurinom	1	Operationsmaterial
	-----	
Summe	13	
<i>Gesunde Hirnsubstanz aus Autopsieproben</i>		
Graue Substanz	9	Autopsieprobe
Weißer Substanz	9	Autopsieprobe
	-----	
Summe	18	

**Tabelle 1: Übersicht der immunhistochemisch untersuchten Gewebeproben**

#### 4.1.2. Materialien

In der Tabelle 2 sind alle verwendeten Materialien aufgelistet.

Materialienname	Firma	Herstellungsort
Super Frost® Plus Objektträger, gebrauchsfertig Polysine® Objektträger, gebrauchsfertig	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
Deckgläser, 24x60mm	Menzel-Gläser®	Braunschweig, Deutschland
Lösungsmittel		
Aceton, reinst Xylol, reinst Ethanol (50-, 70-, 96-%)	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Puffer-Substanzen		
TRIZMA® Base TRIZMA® Hydrochlorid	SIGMA® -Aldrich Chemie GmbH	Dreisenhofen, Deutschland
NaCl, reinst	E. Merck	Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20	SIGMA® -Aldrich Chemie, GmbH	Dreisenhofen, Deutschland
ChemMate™ Detection Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biotinylierter Sekundär-Antikörper</li> <li>• Streptavidin-Alkalische Phosphatase</li> <li>• Chromogen Rot 1 (x28)</li> <li>• Chromogen Rot 2 (x28)</li> <li>• Chromogen Rot 3 (x28)</li> <li>• AB Substrat Puffer</li> <li>• Levamisol (x501)</li> </ul>	DAKO Diagnostika	Hamburg, Deutschland
Kaninchen Anti-Human-NCAM-140 polyklonaler Primär-Antikörper (CD 56)	Chemicon International®	Temecula, USA

Antikörper-Verdünnungslösung	Zymed	San Francisco, USA
Eosin Y Lösung, alkoholisch Hämatoxylin-Lösung	SIGMA®-Aldrich	Dreisenhofen, Deutschland
Eindeckmaterialien		
Glycerol Gelatine (für Mikros- kopie), gebrauchsfertig	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Schnelleindeckmittel für histo- logische und zytologische Präparate	Pertex® medite	Burgdorf, Deutschland
Verbrauchsmaterialien		
Pinself	PELIKAN®	Hannover, Deutschland
Bearbeitungsklingen	FEATHER®-Microme Blades	Japan
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Materialien für die Immunhistochemie**

### 3.1.3. Geräte

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die benutzten Geräte und ihre Hersteller wieder.

Gerät	Firma	Herstellungsort
Mikrotom HM 335 E	MICROM GmbH	Walldorf, Deutschland
Wasserbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Hitzeschränk Typ 54010	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Inkubator Kelvitront®	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Laborzentrifuge pico	Heraeus Instruments	Osterode, Deutschland

Vortex-Genie 2™	Scientific Industries	Bohema, USA
Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
1000µl, 200µl, 10µl, 2-20µl Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss®	Jena, Deutschland
AxioVision Version 3.1	Carl Zeiss®	Jena, Deutschland

**Tabelle 3: Übersicht der Geräte für die Immunhistochemie**

## **4.2 Methoden**

### *4.2.1. Herstellung der Lösungen und Puffer*

#### *a) 0,1%-iger TWEEN 20/TRIS-Puffer*

Dazu wurden 17,125 g TRIS-HCl, 2,25 g TRIS-Base und 21,95 g NaCl in 2,5 l destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurden 2,5 ml TWEEN 20 zugegeben und die ganze Lösung unter gründlichem Schütteln vermischt.

#### *b) NCAM-Antikörper-Lösung*

Der polyklonale Primärantikörper gegen humanes NCAM-140 wurde mit der Antikörperverdünnungslösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

#### *c) Farb-Substrat-Lösung*

Die benötigten Materialien der Farb-Substratlösung sind Bestandteile des ChemMate™Detection Kit. Zur Herstellung der Farbsubstratlösung wurden zu 25 Teilen "AB-Substrat-Puffer", je ein Teil "Chromogen Rot 1", ein Teil "Chromogen Rot 2" und ein Teil "Chromogen Rot 3" in ein Reagenzgefäß hinzugefügt. Anschließend wurde ein Tropfen Levamisol auf 2,5 ml "AB-Substrat-Puffer" gegeben, um die endogene alkalische Phosphatase zu blocken. Alle Komponenten wurden durch Schütteln miteinander vermischt. Es wurde immer nur so viel Volumen an Farb-Substratlösung hergestellt wie für die anzufärbenden Präparate benötigt wurde, da die Farb-Substratlösung nicht länger als 10 Minuten stabil war.

#### *4.2.2. Herstellung der Gewebeschnitte*

Das Gliommateriel wurde nach der Exstirpation für maximal 24 Stunden in Formaldehyd fixiert. Nachfolgend wurden die Tumorproben in Paraffin eingebettet. Um die Präparate mittels Mikrotom schneiden zu können, wurden sie vor der Bearbeitung für 20 Minuten bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom auf 7µm Dicke geschnitten und in einem Wasserbad aufgefangen. In einem zweiten auf 50°C temperiertem Wasserbad wurden die so gewonnenen Gewebeschnitte gestreckt, um eine möglichst glatte Oberfläche ohne Faltung zu erhalten. Mittels beschichteter Objektträger wurden die Gewebeschnitte dann auf die Objektträger aufgezogen. Für 24 Stunden erfolgte die Trocknung im Inkubator bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte vor Beginn der Färbung für 30 Minuten bei 60°C gebacken, um eine maximale Adhäsion an den Objektträger zu erreichen und um bereits jetzt überschüssiges Paraffin abzulösen.

Das ebenfalls verwendete Autopsiematerial und die anderen Tumorgewebeschnitte wurden dem gleichen Procedere unterzogen.

#### *4.2.3 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie*

Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in einer reinen Xylollösung bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit Xylol gespült. Zur Entfernung des noch vorhandenen Paraffins und Rücküberführung in die wässrige Phase wurde das Gewebe mit Hilfe einer absteigenden Xylol-Aceton-Wasser-Reihe ins wässrige Milieu rehydriert. Hierzu verwendet man sowohl reines Aceton, als auch ein Aceton-Wasser-Gemisch mit steigendem Wassergehalt. Nach anschließender ausgiebiger Spülung mit Leitungswasser wurden die Präparate in 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer äquillibriert, in dem die übrige Färbung durchgeführt wird.

#### *4.2.4 Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung*

Da nach erfolgter Anfärbung von NCAM auf den Gewebeschnitten keine sichere Differenzierung zwischen gesundem Gewebe und Gliomgewebe möglich ist, muss jeder Gewebeschnitt in einem Vergleichspräparat mit Hämatoxylin/Eosin-Färbung vorliegen. Die Paraffinablösung erfolgt ebenfalls mit Xylol. Die Präparate wurden nacheinander in Küvetten mit absolutem, 96%-igem, 70%-igem und 50%-igem Ethanol überführt. Anschließend wurden sie mit Leitungswasser und mit destilliertem Wasser gespült.



#### *4.2.5. Antigenmarkierung mit dem Primärantikörper*

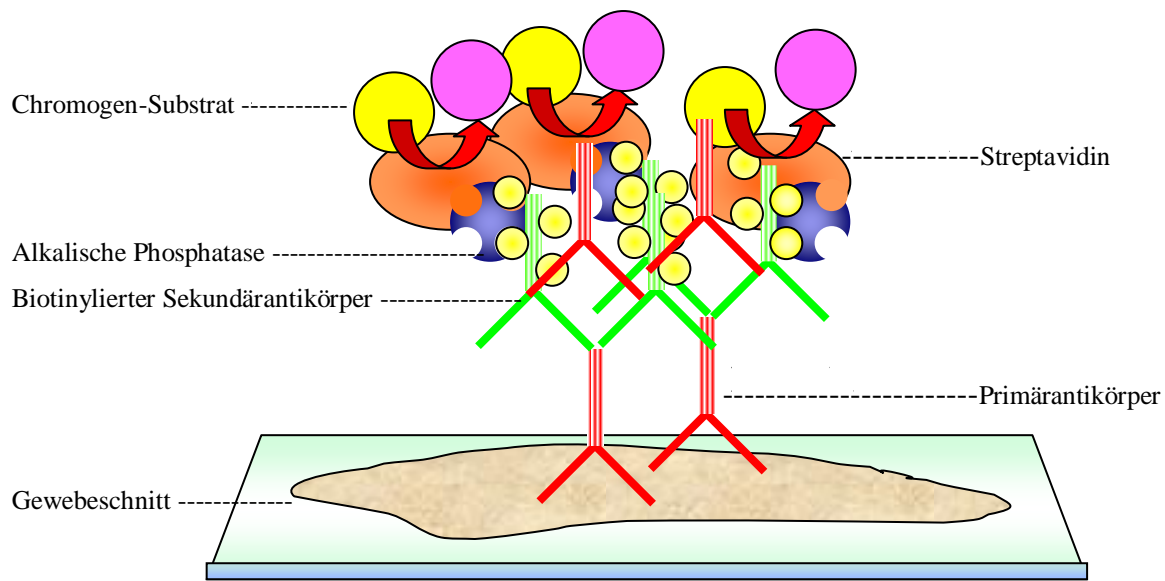
Nach der Äquillibrierung der Präparate mit 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer wurden die Objektträger in die Färbekammern eingesetzt. Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Antikörperverdünnungslösung von Zymed verdünnt. Pro Präparat wurden danach 200µl Primärantikörper-Lösung zügig auf die noch feuchten Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden für 20 Stunden bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden alle Objektträger 10 Minuten lang mit 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer gewaschen, um die überschüssige Antikörperlösung zu entfernen.

#### *4.2.6. Verfahren und Durchführung der Immundetektion*

##### *4.2.6.1. Biochemisches Verfahrensprinzip*

Die Immundetektion erfolgte mit dem DAKO ChemMate™ Detection Kit. Dieser wird zum Nachweis von Antigenen in immunhistochemischen Verfahren eingesetzt. Der Nachweis erfolgt in zwei Schritten. Der Primärantikörper hatte im vorherigen Schritt an die Epitope der NCAM-140-Isoform auf den Gewebeschnitten gebunden. Die nächsten Arbeitsschritte dienen der Sichtbarmachung dieser Primärantikörperbindung an NCAM-140 für das menschliche Auge. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der am konstanten Teil des Primärantikörpers bindet. Nach dem Auftragen und der Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers, wird überschüssiger und nicht gebundener Sekundärantikörper durch wiederholte Waschschrte entfernt. Im zweiten Schritt wird eine Streptavidin-alkalische Phosphatase-Lösung zugegeben. Auf Grund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin bindet Streptavidin an Biotin und somit auch das an Streptavidin konjugierte Enzym, die alkalische Phosphatase, an den biotinylierten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist unter Verwendung eines mit sieben Biotinmolekülen besetzten Spacer-Arms optimal mit Biotin markiert. Daher kann jedes biotinylierte Sekundärantikörper-Molekül mit ausreichend vielen Streptavidinmolekülen reagieren, an die die alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dadurch kommt es zu einer Signalverstärkung und zu einer hohen Sensitivität dieses Nachweissystems (DakoCytomation, Instruction Manual)

Im letzten Schritt der Visualisierung der Immunreaktion wird ein farbloses Chromogen-Substrat benutzt, dass von der alkalischen Phosphatase zu einem roten Niederschlag im Bereich der vom Primärantikörper gebundenen NCAM-140-Moleküle umgesetzt wird. Das Prinzip ist in der Abbildung 5 nochmals schematisch dargestellt.



#### Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immundetektion

NCAM-140-Moleküle werden von dem Primärantikörper detektiert. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Das Enzym alkalische Phosphatase, welches an Streptavidin gekoppelt ist, bindet an das Biotinmolekül. Das Chromogen-Substrat bewirkt einen Farbumschlag, der sich als roter Niederschlag äußert.

#### 4.2.6.2. Technische Durchführung der Immundetektion

Nachdem der Primärantikörper 20 Stunden inkubiert wurde, konnte die Färbung weitergeführt werden. Überschüssige Antikörperlösung wurde durch 10-minütiges Waschen mit 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer entfernt. Danach wurden die Präparate zurück in die Färbekammern gegeben und die noch feuchten Objektträger mit jeweils 200µl biotinyliertem Sekundärantikörper benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde überschüssig vorhandener Sekundärantikörper durch 10-minütiges Waschen mit 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer entfernt. Jetzt erfolgte die Zugabe von jeweils 200µl Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase. Die Inkubationszeit betrug erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur gefolgt von einem Waschvorgang. Danach wurden pro Objektträger 200µl der vorgefertigten Farb-Substratlösung dazugegeben, die für sieben Minuten inkubiert.

Während dieser Inkubation präzipitierte das von der alkalischen Phosphatase umgesetzte Chromogen im NCAM-140-positiven Bereich zu einem roten Niederschlag. Die Reaktion wurde durch Spülen der Präparate in 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer gestoppt. Abschließend wurden die Präparate mit einer Glycerol-Gelatine-Lösung eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 4.2.7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für die Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate war die Gegenfärbung mit Hämatoxylin erforderlich. Dafür wurden die Präparate nach der immunhistochemischen Darstellung von NCAM-140 mit 0,1%-igem TWEEN 20/TRIS-Puffer gewaschen, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und letztlich fünf Minuten in Hämatoxylin inkubiert. Hämatoxylin markiert alle Zellkerne blau, da es an die negativ geladenen Nukleinsäuren der Zellkerne bindet. Die Farbentwicklung des Hämatoxylins erfolgte durch 10- minütige Inkubation der Präparate in nicht destilliertem Leitungswasser. Somit wurde ein optimaler Farbkontrast zwischen NCAM-140-positiven und -negativen Tumorarealen erzielt. Abschließend wurden die Präparate mittels einer Glycerol-Gelantine-Lösung eingedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 4.2.8. Doppelte Durchführung der Experimente und Bewertung durch mehrere Untersucher

Jede Färbung wurde zweifach ausgeführt. Die Auswertung erfolgte von zwei unabhängigen Untersuchern (Dr. med. S. Kuhn, P. Dünisch). Dabei wurde ermittelt, wie viel Prozent der Zellen welche Intensität der NCAM-140-Immunreaktivität aufweisen.

#### 4.2.9. Messmethoden und Auswertung

Alle gefärbten Präparate wurden in drei Schritten, mit dem bloßen Auge, unter dem Lichtmikroskop und densitometrisch ausgewertet. Es wurden bewusst zwei subjektive Methoden (Makroskopie und Mikroskopie) einer objektiven Methode (Densitometrie) gegenübergestellt, um den wissenschaftlichen Wert einer eventuellen intraoperativ makroskopischen NCAM-140-Bewertung einschätzen zu können.

##### 4.2.9.1. Makroskopische Bewertung der Gewebeschnitte

Für die makroskopische Auswertung wurden die mit Hämatoxylin gegengefärbten NCAM-140-Präparate genutzt. Die mit bloßem Auge erkennbare Stärke der NCAM-140-Expression wurde subjektiv eingeschätzt. Dafür wurde die Expressionsstärke von NCAM-140 anhand der sichtbaren Rotfärbung in 5 Gruppen eingeteilt.

Stärke der NCAM-140-Immunfärbung	zugeordneter Wert	NCAM-140-Expression
negativ	0	keine
schwach	1	schwach
moderat	2	mittel
stark	3	stark
sehr stark	4	sehr stark

**Tabelle 4: Klassifikation der Intensität der NCAM-140-Immunfärbung**

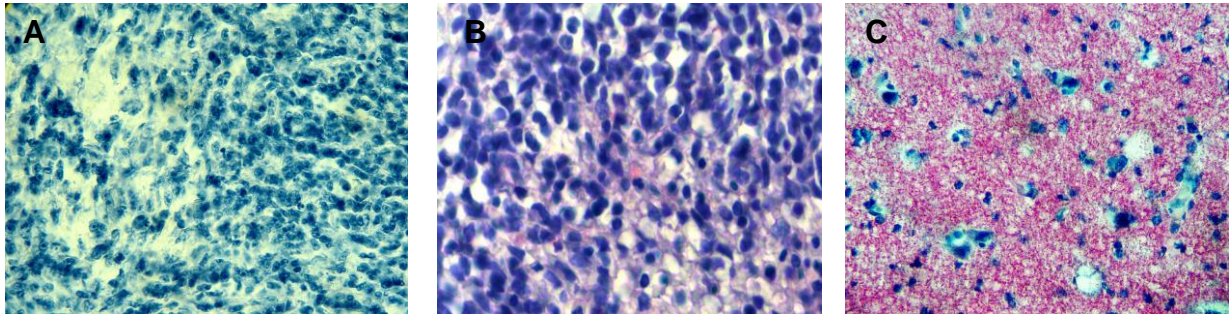
Eine negative NCAM-140-Expression lag vor, wenn die Tumorzellen beziehungsweise die Zellen des gesunden Gewebes aus Autopsieproben keine Rotfärbung zeigten. Mit steigender Intensität der NCAM-140-Immunfärbung wurden die Tumore und das gesunde Hirngewebe in negativ, schwach, moderat, stark oder sehr stark NCAM-140-positiv eingeteilt.

#### 4.2.9.2. Lichtmikroskopische Analyse

Die Intensität der NCAM-140-Immunreaktivität unter Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde mit einem Lichtmikroskop bei 20- und 40-facher Vergrößerung untersucht. Es wurden zehn Gesichtsfelder pro Tumorschnitt zufällig ausgewählt. In diesen Gesichtsfeldern wurde die Expressionsstärke der Tumorzellen für NCAM-140 subjektiv bestimmt. Die Tabelle 5 veranschaulicht das Vorgehen. Es wurde festgestellt, wie viel Prozent der Zellen im Gesichtsfeld NCAM-positiv waren. Danach wurde die Stärke der NCAM-140-Positivität bestimmt. Um diese mikroskopische Beobachtung semiquantitativ zu erfassen, wurde die Stärke der Immunreaktivität in fünf Gruppen eingeteilt. Jeder Gruppe wurde ein Zahlenwert zugeordnet. Einer negativen Immunoreaktivität wurde der Zahlenwert 0 zugeordnet. Eine schwache NCAM-140-Expression verbunden mit einer schwachen Immunoreaktivität erhielt den Wert 1. Der Zahlenwert 2 wurde für eine mittlere Expressionsstärke vergeben und eine starke Expression erhielt den Wert 3. Sehr stark immunreaktiven Geweben wurde der Wert 4 zugeordnet. Anschließend wurden die Mittelwerte des Prozentsatzes der NCAM-140 exprimierenden Zellen pro Gesichtsfeld (siehe Tabelle 5) berechnet und mit dem Zahlenwert für die Stärke der NCAM-140-Immunreaktivität multipliziert. Pro Tumor wurden somit 10 Werte bestimmt, die je nach Histologie und WHO-Grad des Tumors in Gruppen zusammengefasst und statistisch ausgewertet wurden.

Prozent der NCAM-140 positiven Gliomzellen, pro Gesichtsfeld	Mittelwert %	Stärke der NCAM-140-Immunreaktivität	
		Wert	Intensität der Färbung
0	0	0	negativ
1-25	13	1	schwach
26-50	38	2	moderat
51-75	63	3	stark
76-99	87,5	4	sehr stark
100	100		

**Tabelle 5: Prozentsatz der Gliomzellen, die eine NCAM-140-Immunreaktivität pro Gesichtsfeld aufweisen und der Mittelwert der Prozentsätze.** Die Mittelwerte wurden mit dem Zahlenwert der jeweiligen Intensität der Immunoreaktivität (0-4) des Tumors pro Gesichtsfeld multipliziert. Es wurden pro Tumor somit zehn Werte erhalten.



#### Anwendungsbeispiel für die in Tabelle 5 genannten Prozentsätze und Intensitäten:

Dargestellt sind drei exemplarische Gesichtsfelder von verschiedenen Gliomen mit unterschiedlicher NCAM-140-Immunreaktivität der Tumorzellen (40-fache Vergrößerung). Es handelt sich um die mit Hämatoxylin gegengefärbten NCAM-140-Präparate. Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin sind die Zellkerne blau gefärbt. Je nach NCAM-140-Expressionsdichte der Tumorzellen erkennt man einen mehr oder weniger intensiv rosa gefärbten Zytoplasmasaum um die Zellkerne. Im Bild A zeigen 100% der Gliomzellen keine NCAM-140-Immunreaktivität. Bild B zeigt einen Ausschnitt von einem Gliom bei dem 1-25% der Tumorzellen schwach zytoplasmatisch und fortsatzbezogen NCAM-140-positiv sind. Ein Gesichtsfeld von einem Gliom dessen Zellen alle stark NCAM-140-positiv sind ist im Bild C dargestellt. Nachfolgend ist dokumentiert wie nun die Zahlenwerte für die statistische Auswertung berechnet wurden.

Bild	% der NCAM-140 positiven Zellen pro Gesichtsfeld	Mittelwert %	x	Intensität der NCAM-140-Immunfärbung	=	Zahlenwert
A	0	0	x	0	=	0
B	1-25	13	x	1	=	13
C	100	100	x	3	=	300

#### 4.2.9.3. Densitometrische Auswertung der Expressionsstärke

Die Densitometrie ist eine quantitative Messmethode der Farbdichte, das heißt der Farbmenge pro Flächeneinheit. Dabei werden Farbwerte in Graustufen umgewandelt, aber keine Farbtöne bestimmt. Mit dieser Methode kann man die Linearität zwischen Farbmenge und optischer Dichte bestimmen. Je mehr Farbe vorhanden ist, desto weniger Licht wird reflektiert. Voraussetzung dafür ist es, dass nur eine Farbe in Grauwerte umgewandelt wird. Da nur die Gewebeschnitte verwendet werden, bei denen sich die NCAM-140-Reaktivität im Niederschlag eines roten Farbsubstrates äußert, war eine densitometrische Messung der Dichte des Farbniederschlags möglich. Die Dichte des Farbniederschlags entsprach wiederum der Intensität der Immunoreaktivität und damit der Dichte des Antigens. Für die densitometrische Messung der Intensität der Immunreaktivität der NCAM-140-Präparate wurde das Bildanalyse-System IMAGE 1.41 vom National Institutes of Health (NIH) für Macintosh Computer benutzt. Vor Beginn der Messung wurde das Programm mit Grenzwerten der Farben Weiß (0) und Schwarz (255) kalibriert. So entstand eine lineare Standardkurve. Die NCAM-140-Präparate ohne Gegenfärbung wurden im Durchlicht (I=300) auf einem Leuchttisch mit einer Video-(CCD)-Kamera aufgenommen und digitalisiert. Das

Programm wandelt den roten Niederschlag, entsprechend der Intensität in Grauwerte um und berechnet anhand der Standardkurve den Zahlenwert, der sich aus der gemessenen Farbtiefe ergibt. Bei den entstehenden Graustufen ist keine Differenzierung bezüglich Hämatoxylin oder NCAM mehr möglich. Um dennoch die Unterscheidung von Tumorbereich, Infiltrationszonen und Nekrosenzonen zu ermöglichen, werden die densitometrisch gemessenen Gewebeschnitte mit den identischen H/E-Präparaten verglichen und markiert. Die densitometrische Messung wurde in jeder Tumorprobe an zehn verschiedenen, zufällig ausgewählten Stellen drei Mal wiederholt. Die erhaltenen Zahlenwerte wurden notiert, anschließend statistisch erfasst und ausgewertet.

#### *4.2.9.4. Statistische Auswertung*

Die makroskopisch, lichtmikroskopisch und densitometrisch erhaltenen Messwerte wurden mit dem Programm SPSS Version 12.0.2 für Windows SPSS entsprechend der Tumorphistologie und des WHO-Grades in den jeweiligen Gliomgruppen erfasst. Anschließend wurden die Mittelwerte berechnet. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den einzelnen Gliomentitäten, den anderen Hirntumoren und der gesunden Hirnsubstanz aus den Autopsieproben wurden mittels Mann-Whitney-Test auf Signifikanz ( $p < 0,05$ ) geprüft, sofern genug Gewebeproben aus den einzelnen Tumorguppen vorhanden waren.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Makroskopische Analyse des NCAM-140**

#### *5.1.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe*

Die gesunde graue Substanz war in sieben von neun Fällen sehr stark NCAM-140-positiv. Lediglich zwei Gewebeschnitte zeigten eine starke Färbung. Eine schwache Färbung oder eine NCAM-140-Negativität wurde bei keiner Gewebeprobe beobachtet.

#### *5.1.2. NCAM-140 in Gliomen*

Glioblastome vom WHO-Grad IV (n=43) zeigten überwiegend eine negative (n=8) bis schwache (n=32) NCAM-140-Immunfärbung. Zwei Vertreter dieser Gruppe waren moderat, ein Glioblastom stark gefärbt.

Bei den Astrozytomen vom WHO-Grad III zeigte sich eine breitere Verteilung. Sechs Astrozytome WHO-Grad III waren negativ hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität. Bei vier weiteren Vertretern zeigte sich eine schwache Immunfärbung. Weiterhin waren drei Astrozytome WHO-Grad III moderat und ein Tumor dieser Gruppe stark gefärbt.

Der Hauptteil der untersuchten II-gradigen Astrozytome war moderat NCAM-140 positiv. Von 15 untersuchten Astrozytomen WHO-Grad II waren drei Tumore schwach NCAM-140 positiv. Acht Vertreter dieser Gruppe zeigten eine moderate NCAM-140-Immunreaktivität und vier Astrozytome WHO-Grad II zeigten eine starke NCAM-140-Expression.

Bei den vier Astrozytomen WHO-Grad I zeigte sich in allen Fällen eine starke NCAM-140-Immunfärbung.

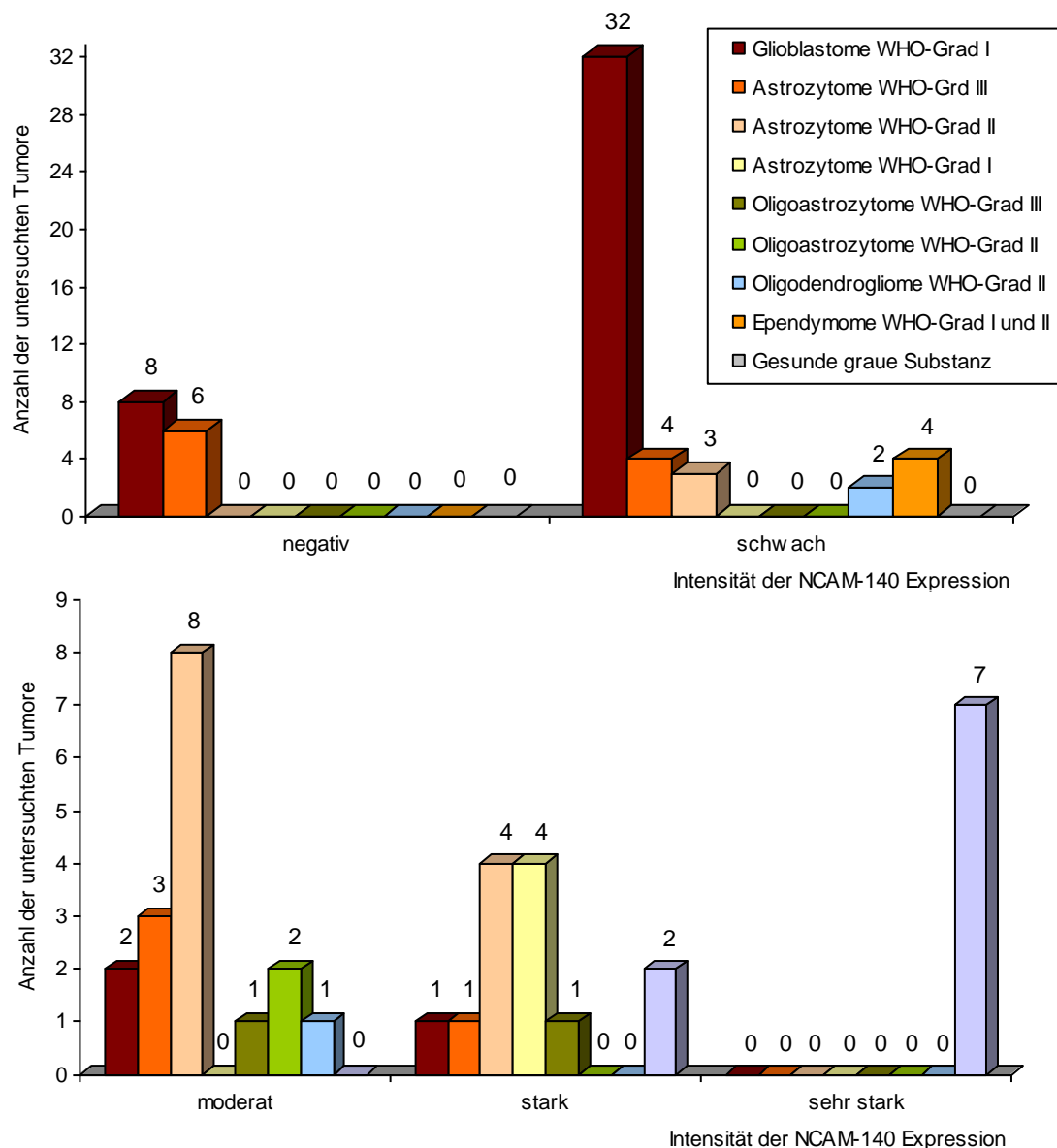
Die Oligoastrozytome WHO-Grad II (n=2) zeigten alle eine moderate Expression des Oberflächenmoleküls NCAM.

Dagegen waren Oligoastrozytome WHO-Grad III zum einen moderat (n=1), zum anderen stark NCAM-140-positiv (n=1).

In der Gruppe der Oligodendrogliome vom WHO-Grad II zeigten zwei Tumore eine schwache und ein Tumor eine moderate NCAM-140-Immunfärbung.

Ependymome WHO-Grad I und II (n=4) zeigten eine schwache NCAM-140 Immunfärbung.

Von den untersuchten Gliomen wies kein Tumor eine sehr starke Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls auf. Die beschriebenen Ergebnisse sind in den folgenden zwei Abbildungen veranschaulicht.



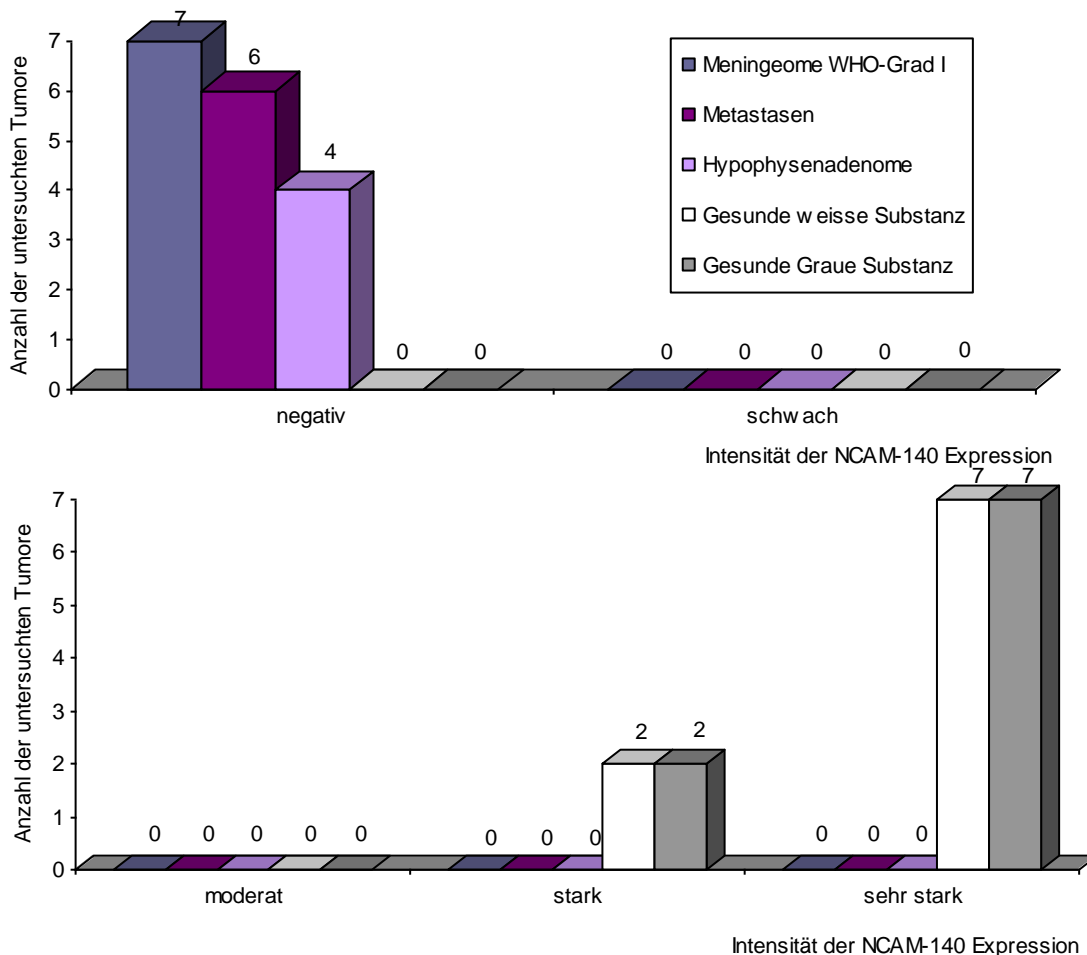
**Abbildung 6: Semiquantitative makroskopische Erfassung der Immunreaktivität für NCAM-140 von 87 Gliomen unterschiedlicher Malignität und Histologie und von 9 Gewebeproben der gesunden grauen Substanz.**

Von den untersuchten Gliomentitäten zeigten Glioblastome überwiegend eine negative bis schwache NCAM-140 Immunfärbung. Lediglich zwei Vertreter waren moderat und ein Glioblastom stark gefärbt. Anaplastische Astrozytome WHO-Grad III waren hauptsächlich negativ hinsichtlich der NCAM-140-Expression. In vier von vierzehn Fällen zeigten sie eine schwache NCAM-140-Immunfärbung, drei Vertreter wiesen eine moderate und einer eine starke NCAM-140-Immunreaktivität auf. Astrozytome WHO-Grad II zeigten in drei Fällen eine schwache, in acht Fällen eine moderate und in vier Fällen eine starke NCAM-140-Reaktivität. Ausschließlich stark gefärbt waren Astrozytome WHO-Grad I. Jeweils ein Oligoastrozytom WHO-Grad III war stark positiv für NCAM-140 und ein Tumor war moderat NCAM-140-positiv, wohingegen Oligoastrozytome WHO-Grad II alle eine moderate Anfärbungen aufwiesen. Bei den Oligodendrogliomen WHO-Grad II zeigten zwei Vertreter eine schwache und ein Vertreter eine starke NCAM-140-Immunreaktivität. Ependymome WHO-Grad I und II waren schwach NCAM-140-positiv. Gesunde graue Substanz war in sieben von neun Fällen sehr stark NCAM-140-positiv. Lediglich zwei Gewebeschnitte zeigten eine starke Färbung.



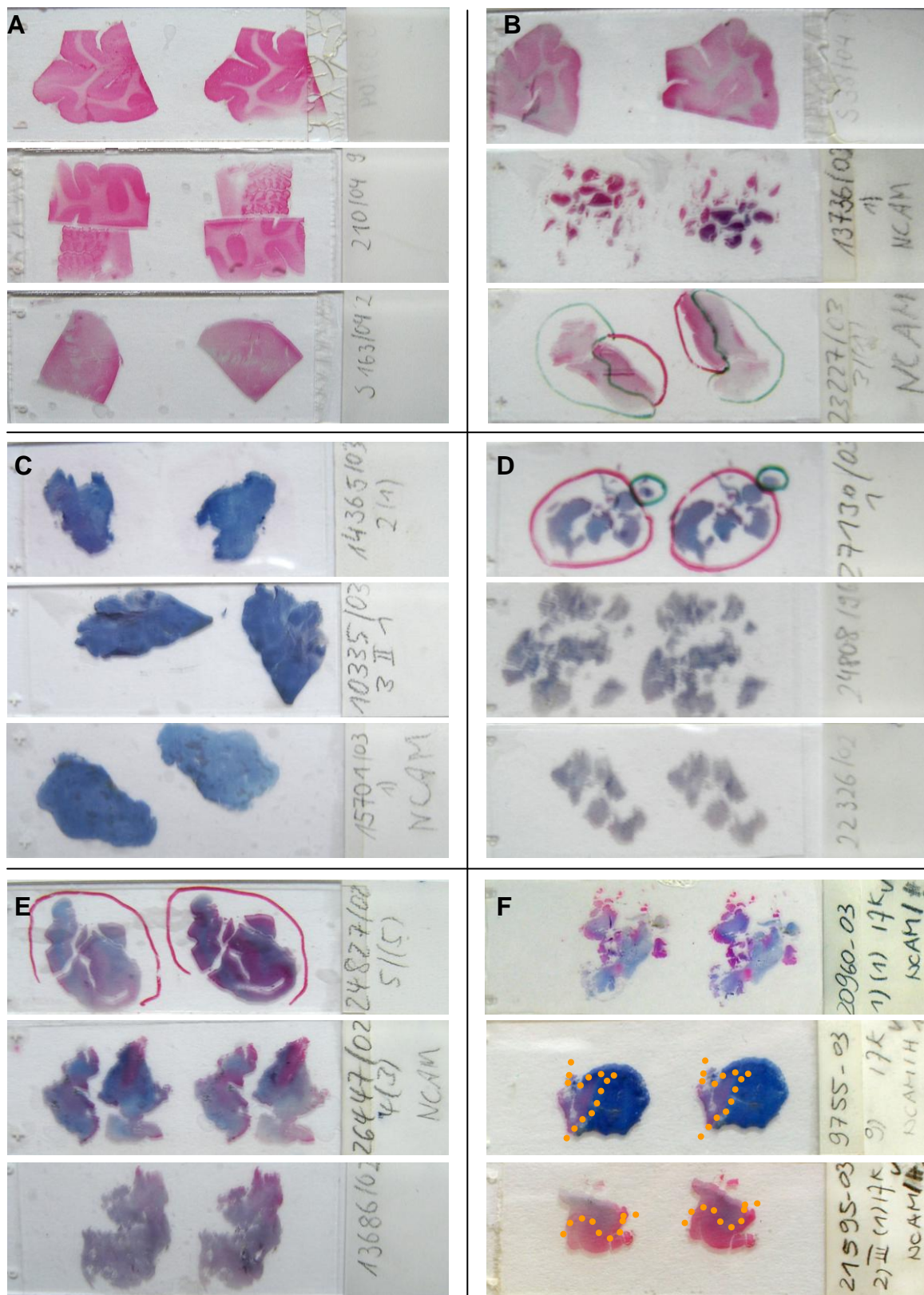
### 5.1.2 NCAM-140 in anderen Hirntumoren

Weiterhin wurden sechs intrakranielle Metastasen unterschiedlichen Primariums, vier Hypophysenadenome sowie sieben Meningeome WHO-Grad I makroskopisch ausgewertet und ebenfalls nach Stärke der NCAM-140-Immunreaktivität den oben genannten Gruppen zugeordnet. Als Kontrollwerte dienten neun Gewebeproben der gesunden grauen und weißen Substanz aus Autopsieproben. Wie bereits im Vergleich mit den in Abbildung 6 dargestellten Gliomentitäten, zeigte sich im gesunden Hirngewebe in sieben Fällen eine sehr starke NCAM-140-Expression sowie in zwei Fällen eine starke Reaktivität gegenüber NCAM-140. Meningeome WHO-Grad I, Metastasen und Hypophysenadenome waren ausschließlich NCAM-140-negativ. Bei allen Vertretern dieser Gruppe konnte makroskopisch keine NCAM-140-Immunfärbung und somit keine NCAM-140-Expression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Semiquantitative Erfassung der NCAM-140-Immunreaktivität von den untersuchten intrakraniellen Tumoren nicht gliomatösen Ursprungs (Tabelle getrennt)**

Metastasen, Hypophysenadenome und Meningeome WHO-Grad I zeigten keine NCAM-140-Immunfärbung und sind bezüglich der NCAM-140-Expression negativ. Das als Kontrollwert makroskopisch untersuchte gesunde Gewebe wies im Vergleich eine starke bis sehr starke NCAM-140-Immunoreaktivität auf.



**Abbildung 8: Makroskopische Beurteilung der NCAM-140-Immunreaktivität**

Die Bilder A, B, C, D, E und F zeigen die verschiedenen makroskopisch eingeordneten Intensitäten der NCAM-140 Immunreaktivität.

**A** – sehr starke NCAM-140-Expression bei gesunder grauer und weißer Substanz.

**B** – starke NCAM-140-Expression bei gesundem Autopsiegewebe und Astrozytomen WHO-Grad I

**C** – negative NCAM-140-Expression bei Glioblastomen WHO-Grad IV

**D** – schwache NCAM-140-Expression bei einem Astrozytom WHO-Grad II, III und IV

**E** – moderate NCAM-140-Expression der Invasionszonen von Glioblastomen WHO-Grad IV

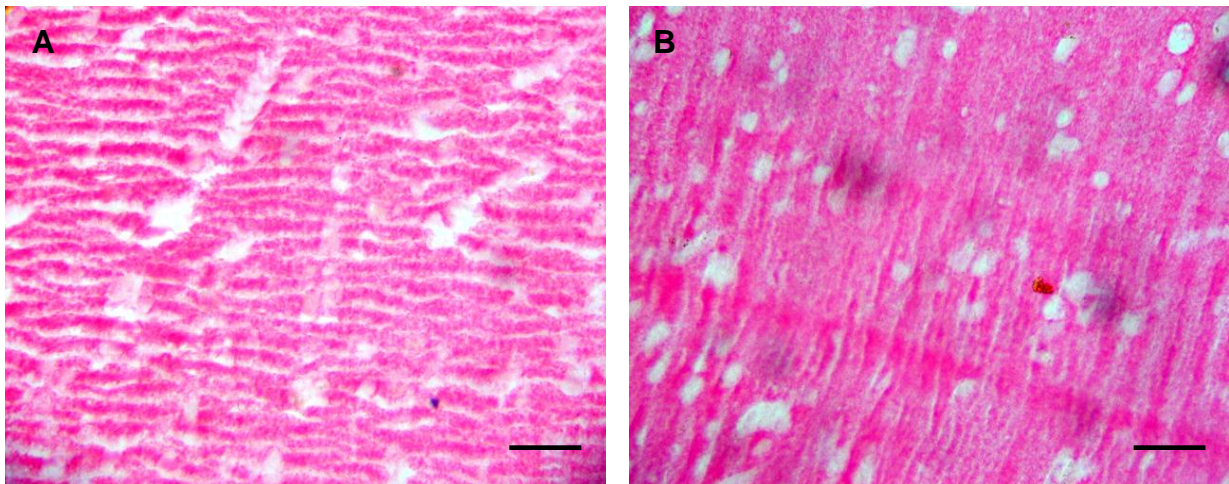
**F** – deutliche Grenze zwischen NCAM-positiven und -negativen Gewebe (gelbe Punktlinie) bei einem Astrozytom WHO-Grad II und III sowie einem Glioblastom WHO-Grad IV

Für die mikroskopische Analyse der NCAM-140-Expression wurden die Präparate mit NCAM-Immunfärbung und Gegenfärbung mittels Hämatoxylin verwendet. Bei jedem Tumor wurden jeweils zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder subjektiv bezüglich der NCAM-140-Expression untersucht. Jeweils neun Gewebeproben von grauer und weißer Substanz dienten als Kontrollwerte. Die erhaltenen Werte wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet. Das genaue Analyseverfahren ist im „Material und Methoden“-Abschnitt erläutert.

## 5.2. Mikroskopische Analyse der NCAM-140-Expression

### 5.2.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe

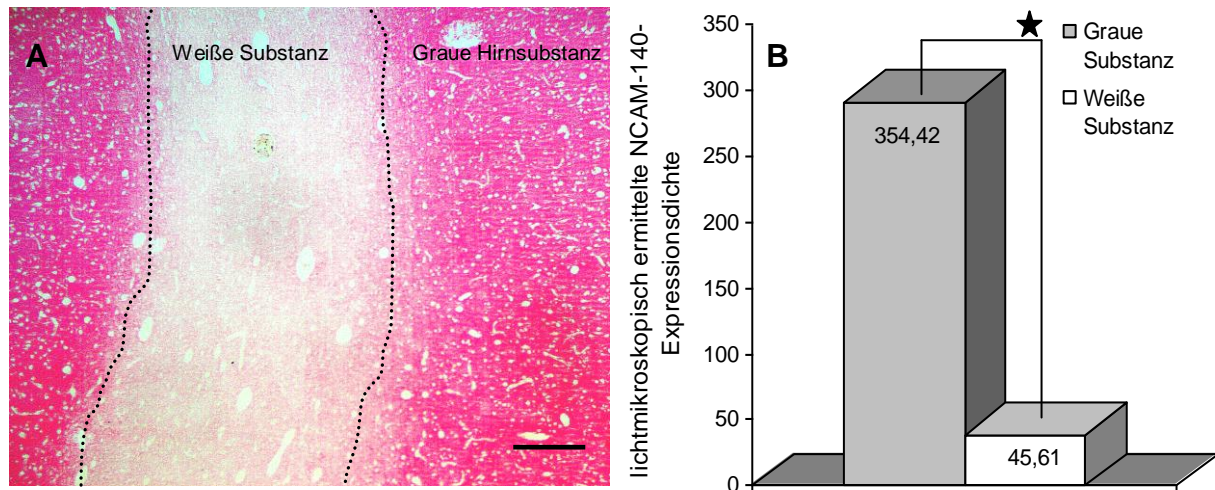
Graue Hirnsubstanz ist das mit Abstand am stärksten NCAM-140 immunreaktive Gewebe. In der lichtmikroskopischen Untersuchung konnte es zur weißen Substanz aus Autopsieproben exakt abgegrenzt werden. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Expression des Oberflächenmoleküls zwischen grauer und weißer Substanz aus Autopsiegewebe. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 9 und 10 veranschaulicht.



**Abbildung 9: Lichtmikroskopische Auswertung der NCAM-140-Expression von grauer Hirnsubstanz tumorfreier Autopsieproben**

Graue Hirnsubstanz ist das mit Abstand am stärksten NCAM-140 immunreaktive Gewebe (**A und B**). Da hier eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin ausblieb, sind die Zellkerne in diesen Bildern nicht dargestellt (NCAM-Präparate, 40-fache Vergrößerung). Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.



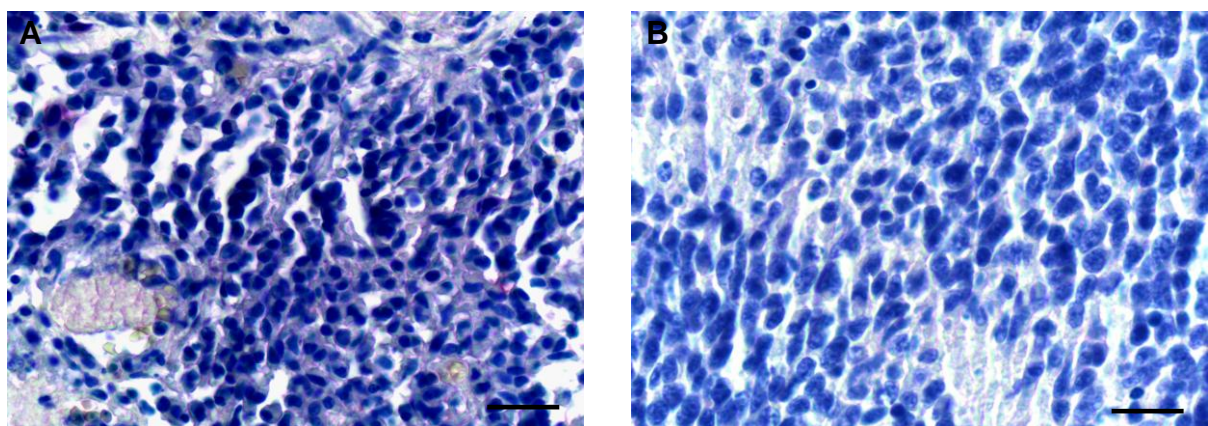


**Abbildung 10: Lichtmikroskopische Auswertung der NCAM-140-Expression von grauer und weißer Hirnsubstanz tumorfreier Autopsieproben**

Im Bild **A** erkennt man den NCAM-140-Expressionsunterschied zwischen gesunder grauer und weißer Substanz (NCAM-Präparat, 20-fache Vergrößerung). Der Balken entspricht einer Länge von 100µm. Die lichtmikroskopisch ermittelten Intensitäten für die NCAM-140-Expression zeigten, dass die graue Substanz deutlich mehr NCAM-140 exprimiert als die weiße Substanz (**B**). Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

### 5.2.2. NCAM-140 in Gliomen

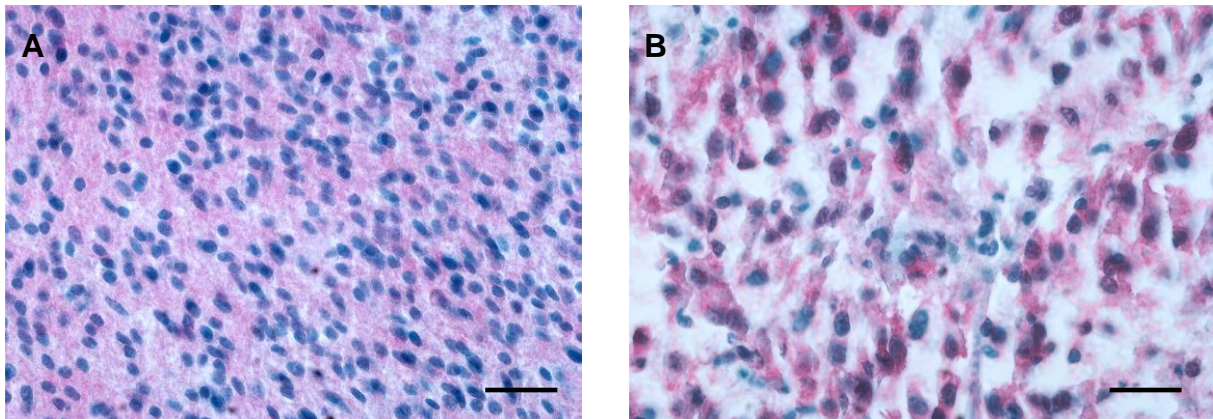
Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Gliome zeigte sich, dass die untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV eine sehr schwache bis gar keine NCAM-140-Expression aufwiesen. In 26 von 45 untersuchten Glioblastomen konnte keine Bindung des NCAM-140-Antikörpers an humanes NCAM-140 nachgewiesen werden. Bei 14 Vertretern dieser Gliomgruppe wurde eine sehr schwache Immunreaktivität ermittelt. Bei fünf Glioblastomen wurde eine moderate NCAM-140-Immunreaktivität beobachtet. Typische Vertreter dieser Gruppe sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Lichtmikroskopie von Glioblastomen WHO-Grad IV (40-fache Vergrößerung).**

Bild **A** veranschaulicht die NCAM-140-Negativität der Glioblastomzellen anhand der NCAM/H-Färbung. In Bild **B** ist ein weiterer Vertreter vergrößert dargestellt. Auch hier stellt sich eine NCAM-140-Negativität dar. Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

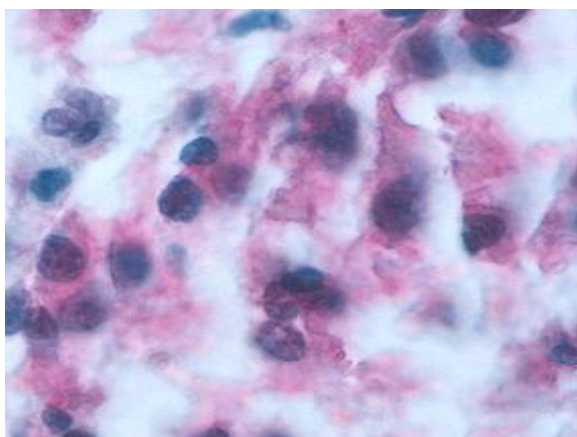
Die lichtmikroskopisch untersuchten Astrozytome WHO-Grad III zeigten teilweise keine oder nur eine schwache NCAM-140-Immunreaktivität. Im Gegensatz zu den Glioblastomen WHO-Grad IV waren hier allerdings bis zu 30% der Zellen pro Gesichtsfeld NCAM-140-positiv. In vier von 16 untersuchten Astrozytomen WHO-Grad III wurde in den betrachteten Gesichtsfeldern eine moderate NCAM-140-Immunreaktivität festgestellt. In der Abbildung 12 sind typische Vertreter dieser Gliomgruppe dargestellt.



**Abbildung 12: Lichtmikroskopie von Astrozytomen WHO-Grad III im NCAM/H-Präparat (40 fache Vergrößerung)**

In Bild A und B kann man deutlich die niedrigeren NCAM-140-Level im Vergleich zu Astrozytomen WHO-Grad II sehen. Eine Immunreaktivität in Form eines roten Niederschlages konnte im Mittel bei 30% der Zellen pro Gesichtsfeld nachgewiesen werden. Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

Typisch und wiederholt feststellbar war insbesondere die zytoplasmatische NCAM-140-Positivität und der Nachweis NCAM-140 tragender Zellfortsätze.

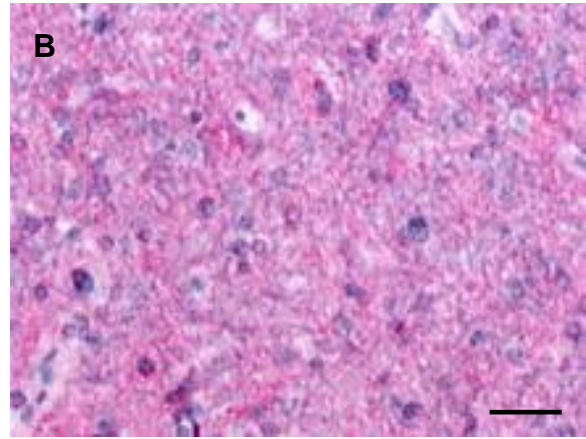
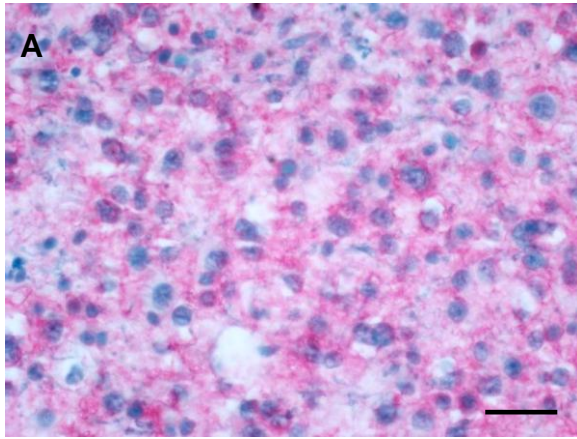


**Abbildung 13: Lichtmikroskopie von einem Astrozytome WHO-Grad III im NCAM/H-Präparat (160 fache Vergrößerung)**

Typisch und wiederholt feststellbar war insbesondere die zytoplasmatische NCAM-140-Positivität und der Nachweis NCAM-140 tragender Zellfortsätze.

Bei den Astrozytomen WHO-Grad II waren in der Mehrzahl der Fälle 50 bis 80% der Zellen schwach bis moderat NCAM-140-positiv. Zwei Tumore zeigten eine sehr schwache NCAM-140-Reaktivität in nur 20% ihrer Zellen. Die Abbildung 14 stellt zwei Vertreter exemplarisch dar.

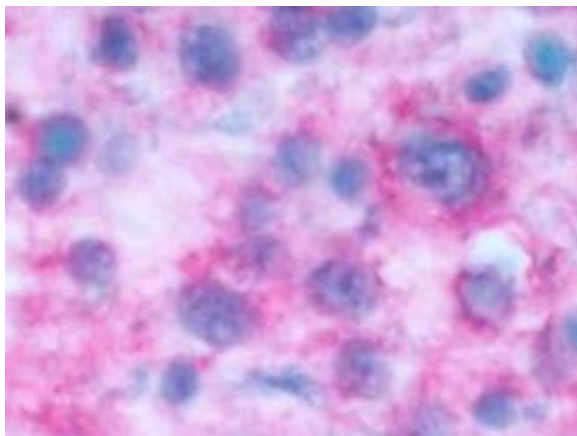




**Abbildung 14: Lichtmikroskopie von Astrozytomen WHO-Grad II im NCAM/H-Präparat (40 fache Vergrößerung)**

Mit steigendem WHO-Grad erhöht sich auch die NCAM-140-Expression. Zwei Vertreter der Astrozytome WHO-Grad II sind hier dargestellt (Bild A und B). Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

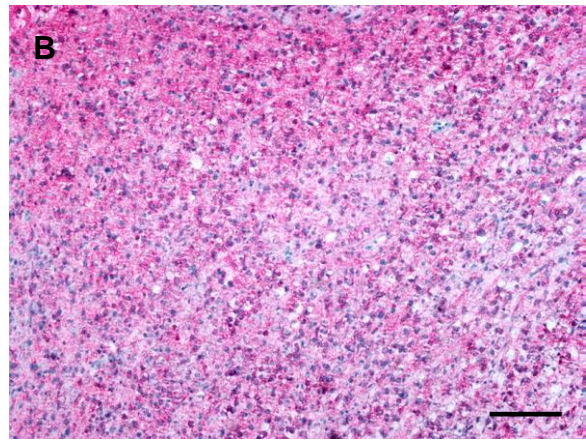
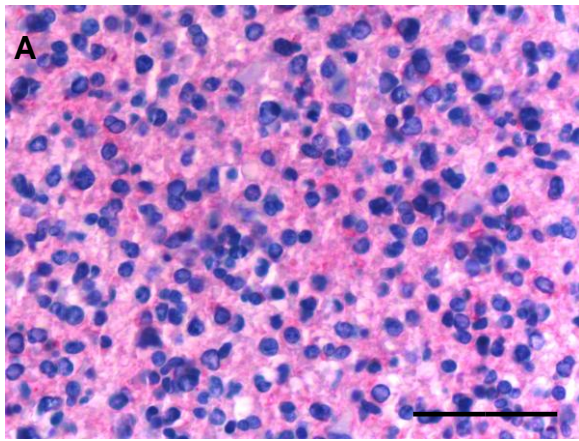
Auch hier konnte das NCAM-140-Antigen zytoplasmatisch und in den Zellfortsätzen beobachtet werden.



**Abbildung 15: Lichtmikroskopie von einem Astrozytome WHO-Grad II im NCAM/H-Präparat (160 fache Vergrößerung)**

NCAM-140 konnte zytoplasmatisch sowie in den Zellfortsätzen beobachtet werden.

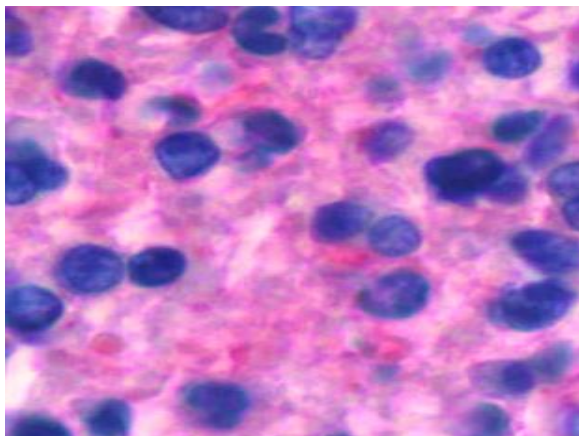
In der Gruppe der Astrozytome WHO-Grad I zeigte sich die höchste Expressionsrate von NCAM-140 im Vergleich zu den Astrozytomen der WHO-Grade II und III und im Vergleich zu den Glioblastomen WHO-Grad IV. Zwei Tumore von insgesamt vier Astrozytomen WHO-Grad I zeigten in 80% ihrer Tumorzellen eine starke NCAM-140-Positivität, während die anderen zwei Tumore bei 60% ihrer Tumorzellen eine moderate Immunoreaktivität aufwiesen. Die Abbildung 16 stellt NCAM-140-Färbungen mit Hämatoxylin-Gegenfärbung dar, die für diese Tumorgruppe typisch sind.



**Abbildung 16: Lichtmikroskopie von Astrozytomen WHO-Grad I im NCAM/H- Präparat (40 fache Vergrößerung)**

**A) und B)** Diese Tumorgruppe zeigte im Vergleich zu den Astrozytomen WHO-Grad II und III, sowie zu den Glioblastomen WHO-Grad IV die höchste Präsenz des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls. Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

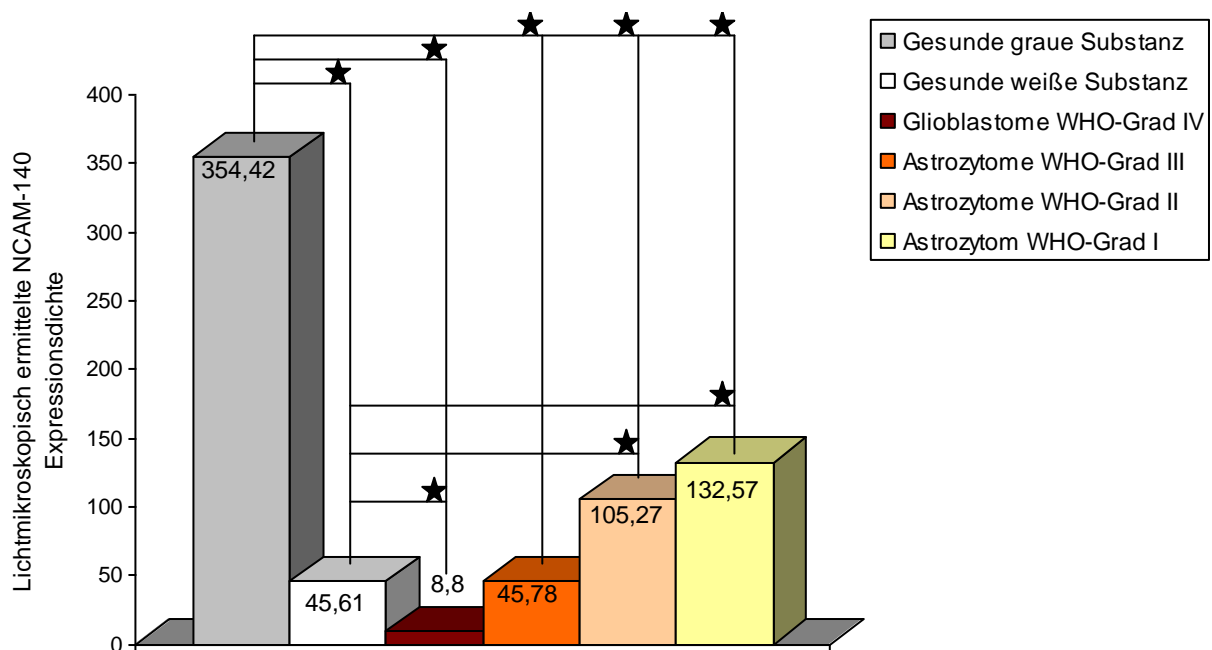
Auch hier fand sich NCAM-140 sowohl zytoplasmatisch als auch in den Zellfortsätzen, wie Abbildung 17 zeigt.



**Abbildung 17: Lichtmikroskopie von einem Astrozytom WHO-Grad I im NCAM/H- Präparat (160 fache Vergrößerung)**

Auch hier fand sich NCAM-140 zytoplasmatisch sowie in den Zellfortsätzen. Die Expression ist gegenüber Astrozytomen der WHO-Grade II und III stark erhöht.

Die Ermittlung der Relativwerte der NCAM-140-Immunoreaktivität erfolgte wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben. Dabei ergab die Signifikanztestung mittels Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen der gesunden grauen Substanz und allen untersuchten Gliomentitäten. Gesunde weiße Substanz exprimiert signifikant weniger NCAM-140 als die Astrozytome der WHO-Grade II und III, sowie signifikant mehr NCAM-140 als die Glioblastome vom WHO-Grad IV. Bei den Gliomen zeigten sich signifikante NCAM-140-Expressionsunterschiede zwischen Glioblastomen vom WHO-Grad IV und Astrozytomen der WHO-Grade I-III. Statistische Unterschiede konnten ebenfalls zwischen den astrozytären Tumoren festgestellt werden. Das Balkendiagramm der Abbildung 18 zeigt die Relativwerte der lichtmikroskopischen Erfassung. Es sind die Glioblastome vom WHO-Grad IV, die Astrozytome der WHO-Grade III, II und I, sowie die gesunde graue und weiße Substanz aus Autopsiegewebe dargestellt.



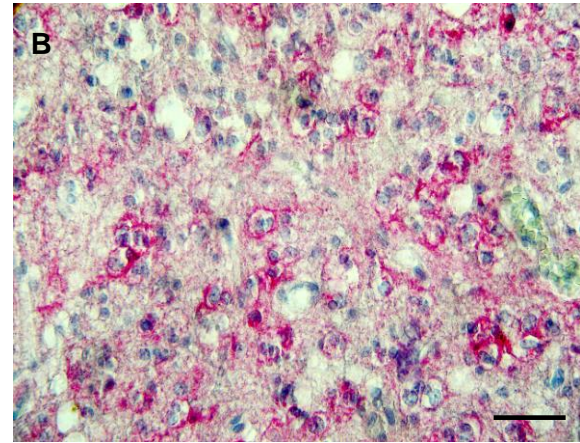
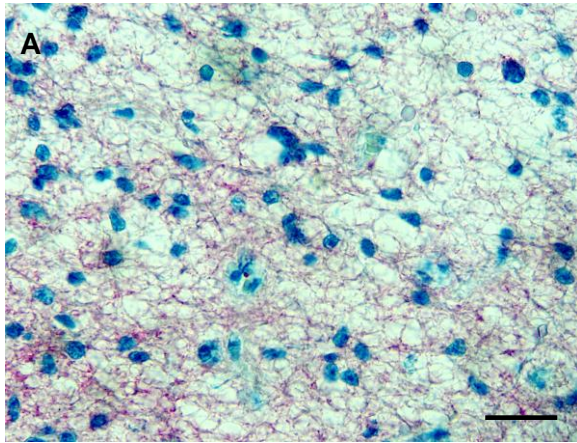
**Abbildung 18: Ergebnisse der lichtmikroskopisch ermittelten Expressionsdichte von NCAM-140 auf humanen Astrozytomen und Glioblastomen im Vergleich zu gesundem Hirngewebe**

Die Glioblastome WHO-Grad IV exprimierten im Vergleich zur gesunden Hirnsubstanz und den restlichen Gliomen signifikant am wenigsten NCAM-140. Im Vergleich zur grauen Substanz aus Autopsieproben zeigten alle Gliome eine reduzierte NCAM-140-Expression. Es wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit jedoch darauf verzichtet die einzelnen Standardabweichungen mit anzugeben. Sie sind in Tabelle 6 auf Seite 45 aufgeführt. Die Sterne geben signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wieder.

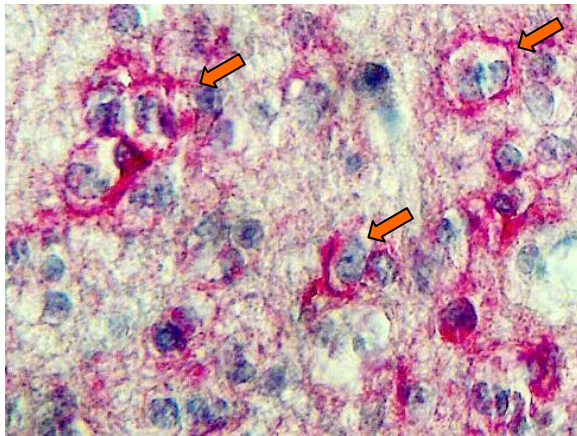
Die untersuchten oligoastrozytären Mischgliome zeigen ebenfalls typische Merkmale in der NCAM-140-Expression. Oligoastrozytome WHO-Grad II wiesen eine schwache bis moderate NCAM-140-Immunreaktivität auf. Durchschnittlich waren bei diesen Vertretern 30-40% der Zellen pro Gesichtsfeld moderat NCAM-140-positiv. Die Oligoastrozytome vom WHO-Grad III zeigten eher eine schwache Expression des neuralen Zelladhäsionsmoleküls, wobei höchstens 20% der beobachteten Zellen eine NCAM-140-Anfärbung aufwiesen. Diese war moderat ausgeprägt.

Oligodendrogliome vom WHO-Grad II zeigten insgesamt eine schwache NCAM-140-Expression. Bei der Analyse der Immunoreaktivität der Oligodendrogliome fiel auf, dass die NCAM-140-Immunpositivität zellmembranständig ausgebildet war. Eine zytoplasmatische NCAM-Positivität konnte nicht festgestellt werden. Das untersuchte Oligodendrogliom vom WHO-Grad III zeigte eine schwache Färbung für NCAM-140. Allerdings konnte es aufgrund der geringen Fallzahl nicht in die statistische Auswertung übernommen werden. Die Abbildung 19 illustriert je einen typischen Vertreter dieser Gliome.





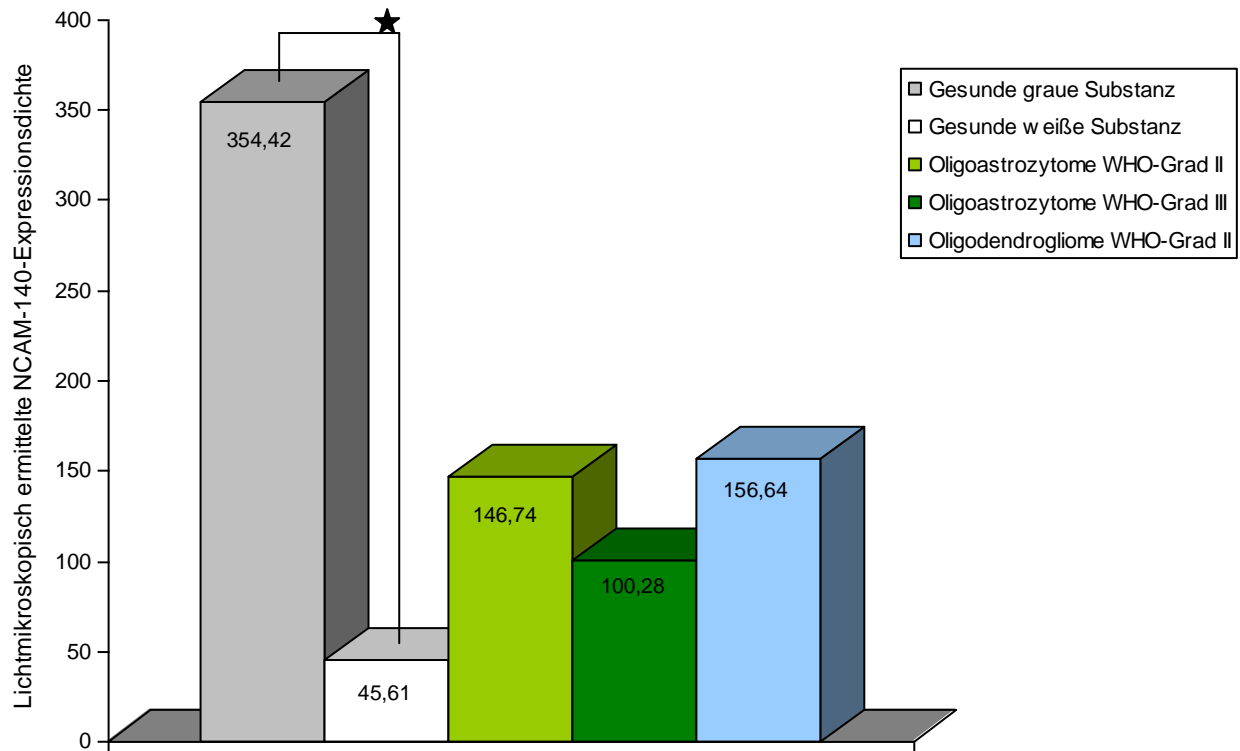
**Abbildung 19: Lichtmikroskopie der NCAM/H-Färbung von jeweils einem repräsentativen Vertreter der Oligoastrozytome WHO-Grad III (A) und der Oligodendrogliome WHO-Grad II (B)** In dem Bild **A** ist ein Oligoastrozytom WHO-Grad III in Bild **B** ein Oligodendrogliom WHO-Grad II dargestellt. Die Pfeile in Bild **B** deuten auf typische Zellen. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.



**Abbildung 20: Lichtmikroskopische Vergrößerung eines Oligodendroglioms vom WHO-Grad II.**

Bei der Betrachtung des Färbemusters der Zellen der Oligodendrogliome ist auffällig, dass die NCAM-140-Immunpositivität an den äußersten Zellrand gedrängt war.

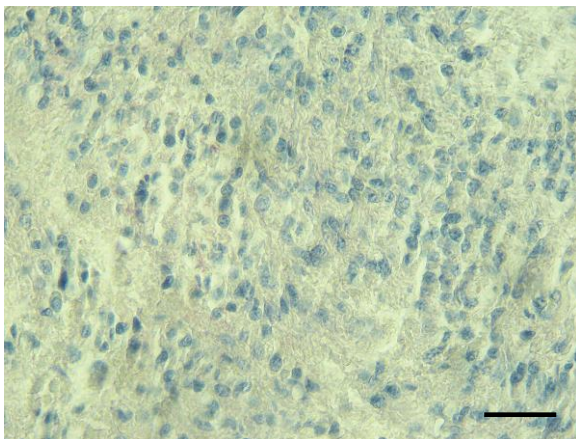
Da jedoch die Fallzahlen der untersuchten Gliome zu niedrig waren um signifikante Unterschiede zu erhalten, wurde hier auf eine Signifikanztestung verzichtet. Das Balkendiagramm der Abbildung 21 zeigt die Relativwerte der lichtmikroskopischen Erfassung. Es sind die Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III, die Oligodendrogliome WHO-Grad II und die graue und weiße Substanz aus dem Autopsiegewebe dargestellt.



**Abbildung 21: Ergebnisse der lichtmikroskopischen Ermittlung der NCAM-140-Expressionsdichte auf humanen Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III sowie Oligodendrogliomen WHO-Grad II.**

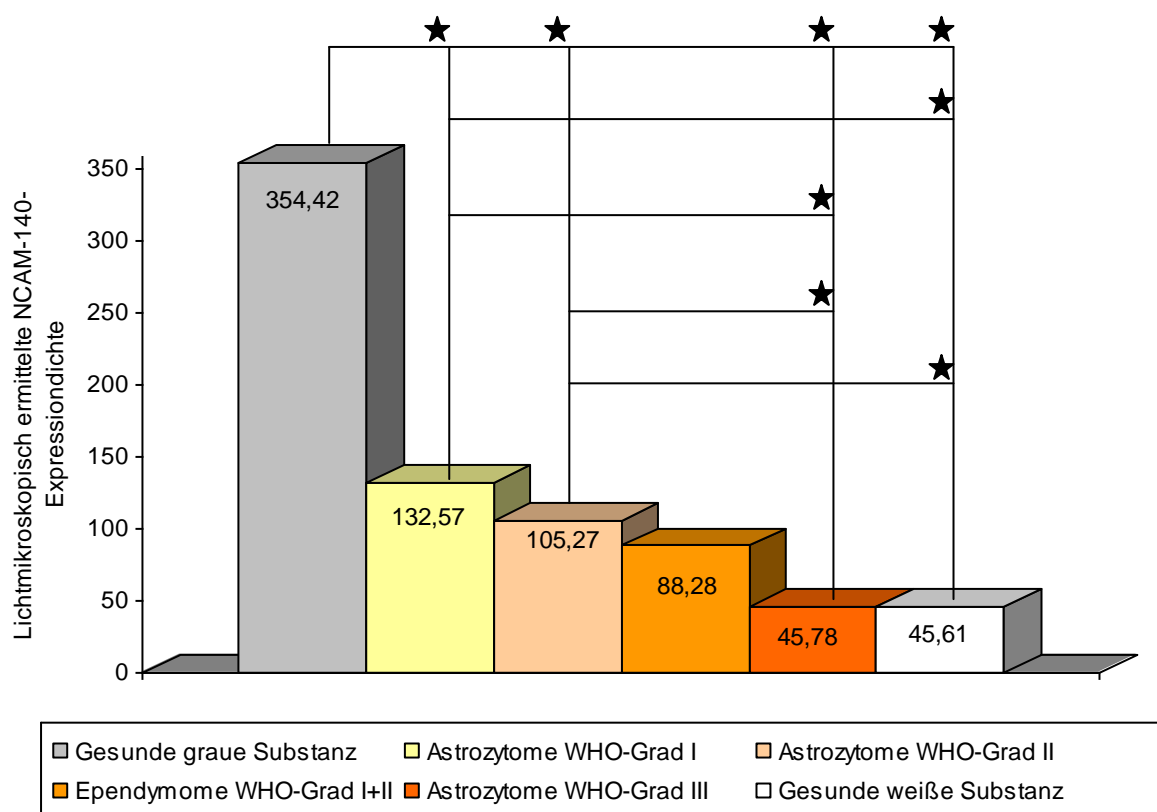
Die drei untersuchten Gliomentitäten exprimierten alle weniger NCAM-140 als die graue Substanz aus Autopsiegewebe und mehr NCAM-140 als die weiße Substanz aus Autopsiegewebe. Aufgrund der geringen Fallzahlen war eine Signifikanztestung nicht möglich.

Alle untersuchten Ependymome der WHO-Grade I und II waren NCAM-140-negativ. Lediglich eine minimale Hintergrundfärbung konnte festgestellt werden, die jedoch nicht einem spezifischen Färbemuster entsprach. Auch hier konnte aufgrund der geringen Fallzahl eine Signifikanztestung nicht durchgeführt werden. Abbildung 22 zeigt einen typische Vertreter dieser Entität.



**Abbildung 22: Lichtmikroskopisches Bild der NCAM/H-Färbung eines repräsentativen Vertreters der Ependymome vom WHO-Grad II**  
Ependymome vom WHO-Grad I und II waren sämtlich NCAM-140-negativ. Der Balken entspricht einer Länge von 50µm.

Ependymome der WHO-Grade I und II exprimieren weniger NCAM-140 als gesunde graue Substanz. Statistische Unterschiede zwischen den Ependymomen der WHO-Grad I und II und Astrozytomen der WHO-Grade I, II und III, sowie gesunder weißer Substanz konnten aufgrund der geringen Fallzahl der untersuchten Ependymome nicht erhoben werden. Das Balkendiagramm der Abbildung 23 zeigt die Relativwerte der lichtmikroskopischen Erfassung. Es sind die Astrozytome der WHO-Grade III, II und I, die Ependymome der WHO-Grade I und II, sowie die gesunde graue und weiße Substanz aus dem Autopsiegewebe dargestellt.



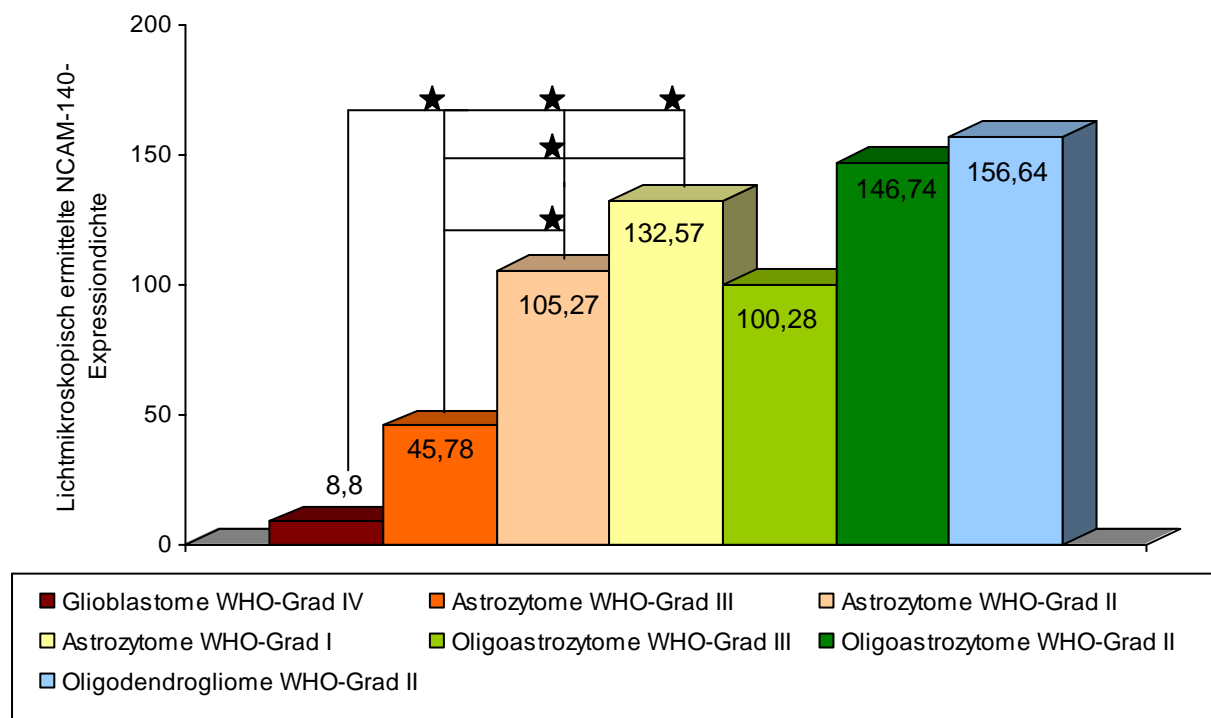
**Abbildung 23: Darstellung der signifikanten Unterschiede in der lichtmikroskopischen NCAM-140-Expression zwischen Ependymomen WHO-Grad I+II und anderen Gliomentitäten.**

Ependymome der WHO-Grade I und II unterscheiden sich zwar von der gesunden grauen Substanz und allen anderen untersuchten hinsichtlich der Expression von NCAM-140, ein signifikanter Vergleich kann aufgrund der geringen Fallzahl der Ependymome vom WHO-Grad I und II nicht durchgeführt werden.

In dem Balkendiagramm der Abbildung 24 sind die Relativwerte der lichtmikroskopischen Erfassung der Glioblastome vom WHO-Grad IV, der Astrozytome der WHO-Grade III, II und I sowie der oligoastrozytären Mischgliome dargestellt. Astrozytome WHO-Grad III exprimierten weniger NCAM-140 als Oligodendrogliome vom WHO-Grad II. Ein statistischer Unterschied zu den untersuchten Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III konnte jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen nicht festgestellt werden. Weiterhin konnten

keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der NCAM-140-Expression zwischen Astrozytomen WHO-Grad I und II, Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III sowie Oligodendrogliomen WHO-Grad II festgestellt werden. Interessant hierbei ist, dass es sich um Gliome mit gleichen WHO-Graden handelt, die sich lediglich morphologisch voneinander unterscheiden. Darauf wird in der Diskussion jedoch näher eingegangen.

Glioblastome vom WHO-Grad IV exprimieren weniger NCAM-140 als alle anderen oligoastrozytären Mischgliome.



**Abbildung 24: Darstellung der signifikanten Unterschiede in der lichtmikroskopischen NCAM-140-Expression zwischen den untersuchten Gliomen.**

Die Glioblastome WHO-Grad IV exprimierten im Vergleich zu den restlichen Gliomen signifikant am wenigsten NCAM-140. Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie Oligodendrogliome WHO-Grad II unterscheiden sich aufgrund der untersuchten geringen Fallzahlen dieser Tumore nicht signifikant untereinander. Die Standardabweichungen sind in Tabelle 6 auf Seite 45 dargestellt.

In Tabelle 6 sind die untersuchten Gliome sowie graue und weiße Substanz aus Autopsiegewebe hinsichtlich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Immunoreaktivität zusammenfassend aufgelistet. Das genaue Analyseverfahren ist Abschnitt „Material und Methoden“ erläutert

Tumor	N	Mittelwert ± Standardabweichung
Glioblastome WHO-Grad IV	45	8,80 ± 18,33
Astrozytome WHO-Grad III	15	45,78 ± 35,24
Astrozytome WHO-Grad II	16	105,27 ± 52,96
Astrozytome WHO-Grad I	4	132,57 ± 65,30
Oligoastrozytome WHO-Grad III	2	100,28 ± 6,29
Oligoastrozytome WHO-Grad II	2	146,74 ± 83,30
Oligodendrogliome WHO-Grad II	3	156,64 ± 75,83
Ependymome WHO-Grad II	2	49,47 ± 39,20
Ependymome WHO-Grad I	2	138,18 ± 22,48
Ependymome WHO-Grad I+II	4	93,83 ± 57,48
Graue Substanz	9	354,42 ± 54,36
Weißer Substanz	9	45,61 ± 16,37
Summe	18	

**Tabelle 6: Übersicht der lichtmikroskopisch ermittelten Werte der NCAM-140-Immunreaktivität**

Die mit Klammern versehenen Gewebeproben wurden aufgrund der geringen Fallzahlen nicht in die Signifikanztestung mit einbezogen.

Die Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den einzelnen Gliomentitäten und der Hirnsubstanz aus den Autopsieproben wurden mittels Mann-Whitney-Test auf Signifikanz ( $p < 0,05$ ) geprüft. Dabei wurde ab einem Wert von  $p < 0,05$  eine Signifikanz angenommen. Das genaue Analyseverfahren ist im Abschnitt „Material und Methoden“ genauer beschrieben.

Die Kreuztabelle 7 zeigt die Gegenüberstellung der untersuchten Gliome einschließlich der Kontrollproben aus der grauen und weißen Substanz aus Autopsieproben. Dabei wird jeweils eine Gliomgruppe allen anderen untersuchten Gewebetypen gegenübergestellt und mit diesen auf einen signifikanten Unterschied hin verglichen. Diese Signifikanzen sind als rot unterlegte Felder dargestellt. Die untersuchten oligoastrozytären Tumore vom WHO-Grad I und II, die Oligodendrogliome WHO-Grad II sowie die Ependymome WHO-Grad I und II unterscheiden sich in der NCAM-140-Expression von allen anderen untersuchten Geweben. Aufgrund der geringen Fallzahlen dieser untersuchten Gliomentitäten, war eine Signifikanztestung jedoch nicht möglich.

Tumore	GB	A III	A II	A I	OA II	OA III	OD II	E I+II	NG	GS	WS
GB											
A III	0,000										
A II	0,000	0,002									
A I	0,000	0,014	0,385								
OA II											
OA III											
OD II											
E I+II											
NG	0,975	0,000	0,000	0,000							
GS	0,000	0,000	0,000	0,003					0,000		
WS	0,000	0,953	0,000	0,006					0,000	0,000	

**Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse der statistischen Auswertung der lichtmikroskopischen Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität.**

Rot markierte Kästchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gliomen anderen Hirntumoren und gesundem Gewebe. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist ebenfalls angegeben.

GB : Glioblastom WHO-Grad IV  
A III : Astrozytom WHO-Grad III  
A II : Astrozytom WHO-Grad II  
A I : Astrozytom WHO-Grad I

OA II : Oligoastrozytom WHO-Grad II  
OA III : Oligoastrozytom WHO-Grad III  
OD II : Oligodendrogliom WHO-Grad II  
E I+II : Ependymome WHO-Grad I+II

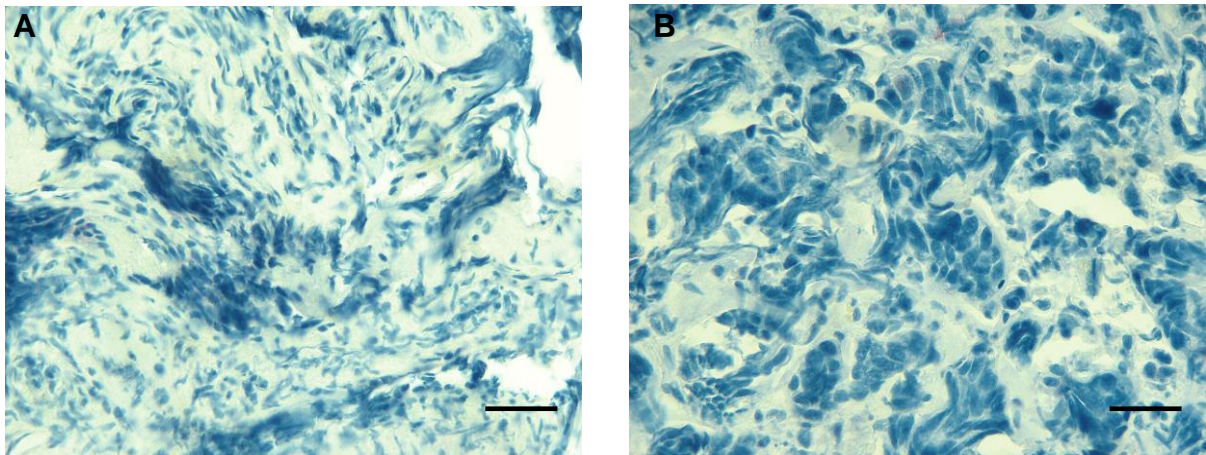
NG :Nicht Gliome  
GS :Graue Substanz  
WS :Weiße Substanz



### 5.2.3. NCAM-140 in anderen Hirntumoren

Neben den hirneigenen Tumoren werden auch Neoplasien unterschieden, die nicht primär im zentralen Nervensystem entstehen, sondern durch Absiedlung maligner Zellen dorthin gelangen. Diese sekundären malignen Tumore klassifiziert man als Hirnmetastasen.

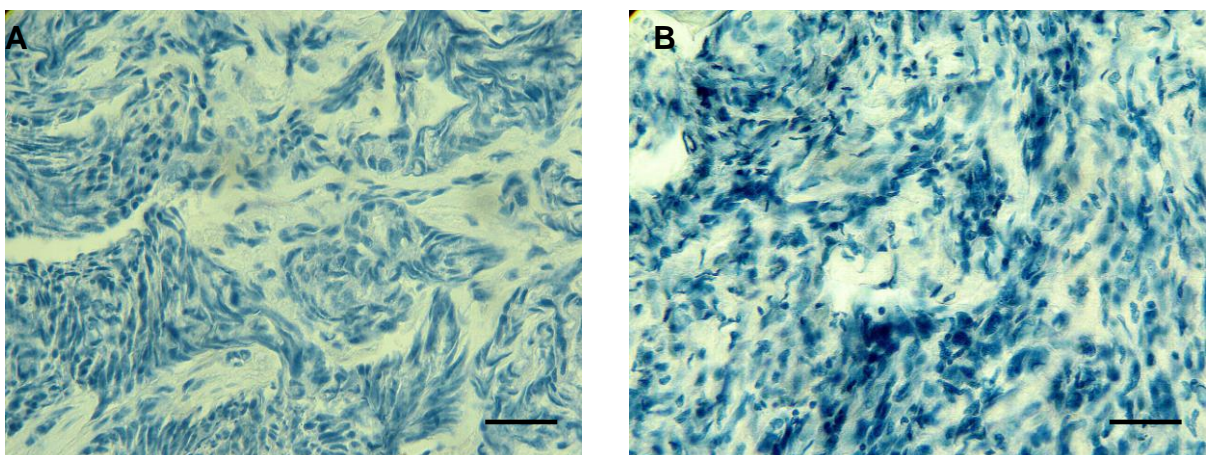
Die untersuchten Hirnmetastasen wiesen in allen Gesichtsfeldern eine negative bis sehr schwache NCAM-140-Expression auf. Das zeigt sich auch in ihrem sehr geringen relativen NCAM-140-Wert von  $2,62 \pm 2,00$ . In der Abbildung 25 sind jeweils repräsentative Vertreter der Metastasen dargestellt.



**Abbildung 25: Lichtmikroskopie NCAM/H-Färbung von jeweils zwei Metastasen (A und B)**

Alle dargestellten Ausschnitte sind NCAM-140 negativ. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

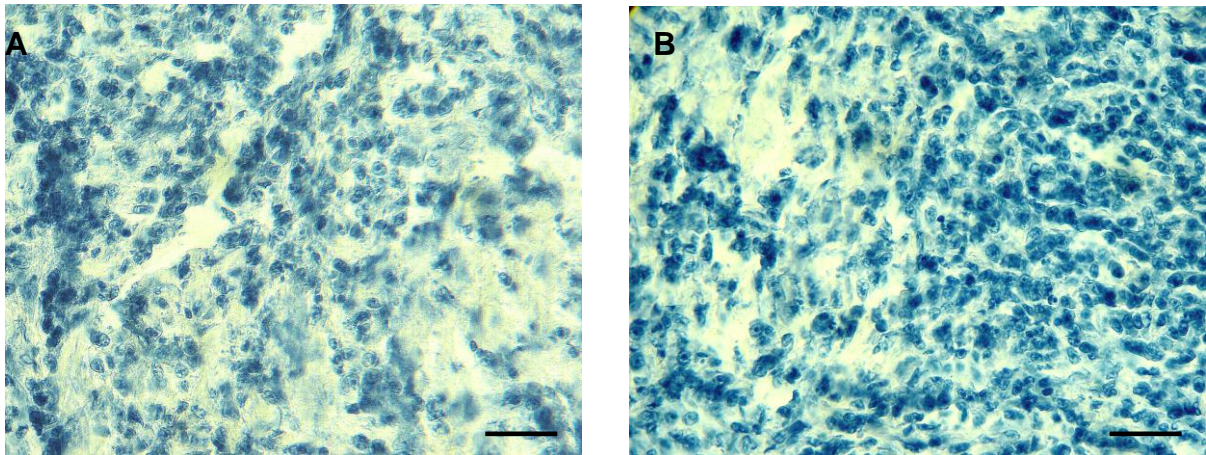
Abbildung 26 zeigt repräsentative Vertreter von Meningeomen. Die Meningeome waren in ihrer NCAM-140-Expression sämtlichst negativ. Die durchschnittliche ermittelte NCAM-140-Expression in Meningeomen betrug  $0,43 \pm 0,79$ .



**Abbildung 26: Lichtmikroskopie NCAM/H-Färbung von jeweils zwei Meningeomen (A und B)**

Alle dargestellten Ausschnitte sind NCAM-140 negativ. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Eine sehr schwache Expression von NCAM-140 konnte in den Hypophysenadenomen festgestellt werden. Sie betrug  $28,74 \pm 19,49$ . Abbildung 27 stellt typische Vertreter dar.



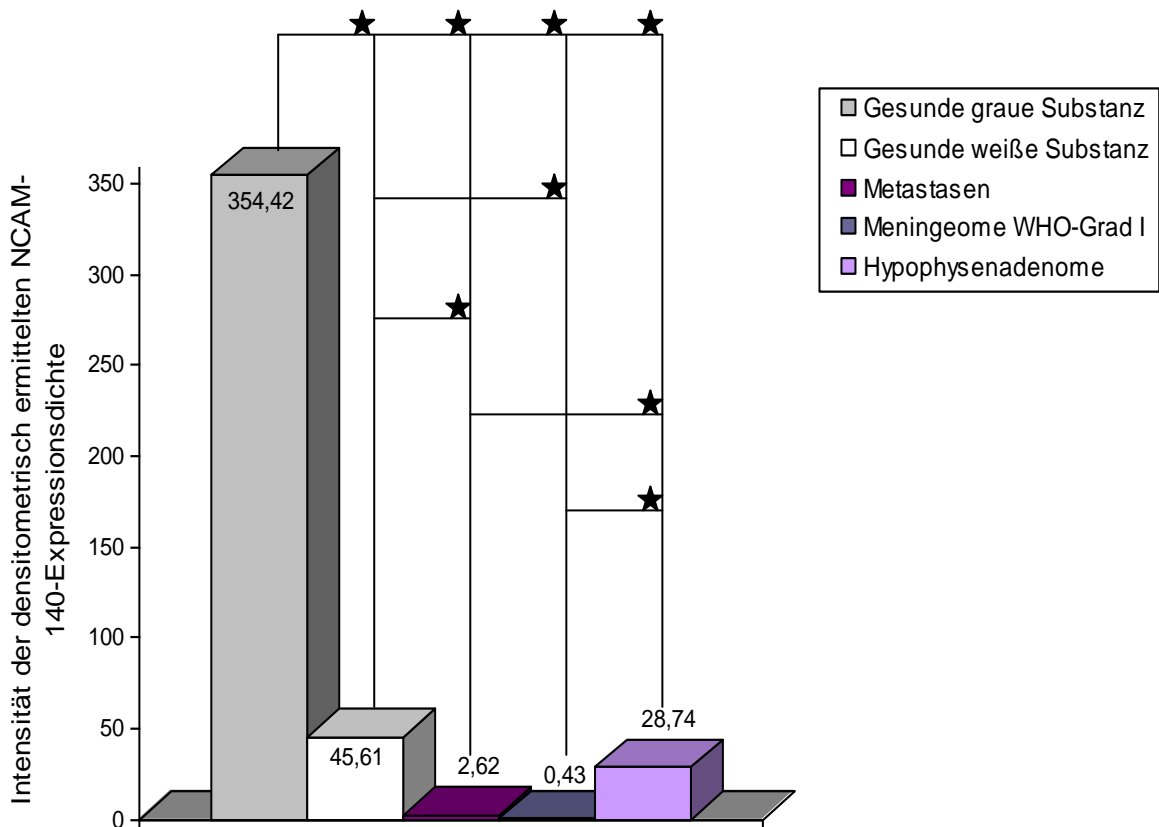
**Abbildung 27: Lichtmikroskopie NCAM/H-Färbung von jeweils zwei Hypophysenadenomen (A und B)**

Alle dargestellten Ausschnitte sind NCAM-140 negativ. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Meningeome WHO-Grad I, Hirnmetastasen und Hypophysenadenome exprimierten signifikant weniger NCAM-140 als die graue Substanz aus Autopsieproben.

Des Weiteren exprimierten Meningeome WHO-Grad I und die untersuchten Hirnmetastasen signifikant weniger NCAM-140 als die weiße Substanz. Ein signifikanter Unterschied zwischen Hypophysenadenomen und der weißen Substanz konnte nicht festgestellt werden. Die untersuchten Meningeome WHO-Grad I und Hypophysenadenome wiesen signifikant weniger NCAM-140 auf als Glioblastome WHO-Grad IV. Darüber hinaus wiesen sowohl Meningeome WHO-Grad I als auch Hirnmetastasen signifikante Unterschiede zu allen anderen Gliomen auf. Hypophysenadenome zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der NCAM-140-Expression gegenüber Astrozytomen WHO-Grad III. Zu allen anderen Gliomen waren die Unterschiede in der NCAM-140-Expression jedoch statistisch signifikant. Das Balkendiagramm der Abbildung 28 zeigt die Relativwerte der lichtmikroskopischen Erfassung. Es sind die Hirnmetastasen, die Meningeome vom WHO-Grad I, die Hypophysenadenome sowie die gesunde graue und weiße Substanz aus dem Autopsiegewebe dargestellt. Die untersuchten Metastasen und die Meningeome WHO-Grad I wiesen lichtmikroskopisch zu den Hypophysenadenomen alle signifikante Unterschiede in der NCAM-140-Expression auf.





**Abbildung 28: Darstellung der Ergebnisse der lichtmikroskopisch festgestellten NCAM-140 Expressionsdichte von Metastasen, Meningeomen WHO-Grad I und Hypophysenadenomen.** Gegenüber der gesunden Hirnsubstanz zeigten alle hier untersuchten Tumore eine reduzierte NCAM-140-Expression. Ebenfalls einen signifikanten Unterschied zeigten Hypophysenadenome im Vergleich zu Meningeomen WHO-Grad I und Metastasen.

In Tabelle 8 sind die untersuchten Hirnmetastasen, Meningeome vom WHO-Grad I, Hypophysenadenome sowie die graue und weiße Substanz aus Autopsiegewebe hinsichtlich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-140-Immunoreaktivität zusammenfassend aufgelistet. Das genaue Analyseverfahren ist im „Material und Methoden“-Abschnitt erläutert.

Tumor	N	Mittelwert ± Standardabweichung
Graue Substanz	9	354,42 ± 54,36
Weiße Substanz	9	45,61 ± 16,37
Summe	18	
Hypophysenadenome	4	28,74 ± 19,49
Metastasen	7	2,62 ± 2,00
Meningeome WHO-Grad I	7	0,43 ± 0,79
Summe	18	

**Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse der NCAM-140-Expression der zusätzlich untersuchten Metastasen, Meningeome WHO-Grad I und Hypophysenadenome**

Die lichtmikroskopisch ermittelten Werte wurden durch den Mann-Whitney-Test statistisch analysiert und mit den Werten der Gliome und denen des Hirngewebes aus den Autopsieproben verglichen und auf signifikante Unterschiede in der NCAM-140-Expression geprüft. Meningeome WHO-Grad I exprimieren signifikant weniger NCAM-140 als alle untersuchten Gliome sowie graue und weiße Substanz aus Autopsiegewebe. Statistische Unterschiede zu Metastasen ließen sich nicht nachweisen.

Hypophysenadenome unterschieden sich hinsichtlich der NCAM-140-Expression signifikant von grauer Substanz aus Autopsieproben. Zu Meningeomen WHO-Grad I und Metastasen ließen sich ebenfalls statistische Unterschiede nachweisen. Eine signifikante Abgrenzung zu Astrozytomen WHO-Grad III konnte nicht festgestellt werden.

Metastasen waren im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Geweben außer Glioblastomen vom WHO-Grad IV signifikant NCAM-140-negativer. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tumor	GB	A III	A II	A I	OA II	OA III	OD II	MI	MTS	HA	GS	WS
GB												
A III	0,000											
A II	0,000	0,002										
A I	0,000	0,014	0,385									
OA II												
OA III												
OD II												
MI	0,030	0,001	0,000	0,006								
MTS	0,793	0,003	0,000	0,006				0,053				
HA	0,009	0,411	0,003	0,029				0,006	0,006			
GS	0,000	0,000	0,000	0,003				0,000	0,000	0,003		
WS	0,000	0,953	0,000	0,006				0,000	0,000	0,199	0,000	

**Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse der statistischen Auswertung der lichtmikroskopischen Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität.**

Rot markierte Kästchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gliomen, Meningeomen WHO-Grad I, Metastasen, Hypophysenadenomen und gesundem Hirngewebe aus Autopsieproben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist ebenfalls angegeben.

GB : Glioblastom WHO-Grad IV  
A III : Astrozytom WHO-Grad III  
A II : Astrozytom WHO-Grad II  
A I : Astrozytom WHO-Grad I

OA II : Oligoastrozytom WHO-Grad II  
OA III : Oligoastrozytom WHO-Grad III  
OD II : Oligodendrogliom WHO-Grad II  
MI : Meningeome WHO-Grad I

MTS : Metastasen  
HA : Hypophysenadenom  
GS : Graue Substanz  
WS : Weiße Substanz

### **5.3. Densitometrische Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität**

Die Densitometrie ist die quantitative Messung der Farbdichte, das heißt der Farbmenge pro Flächeneinheit. Dabei werden Farbwerte in Graustufen umgewandelt, aber nicht verschiedene Farbtöne bestimmt. Mit ihrer Hilfe kann man das Verhältnis von Farbmenge zu optischer Dichte bestimmen, wenn das System zuvor kalibriert wurde. Voraussetzung dafür ist, dass nur eine Farbe in Graustufen umgewandelt wird. Da nur die Gewebeschnitte verwendet werden, bei denen sich die NCAM-140-Reaktivität im Niederschlag eines roten Farbsubstrates äußert, aber keine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt wurde, entsprechen die Graustufen der NCAM-140-Reaktivität und damit der NCAM-140-Antigendichte. Bei den entstehenden Graustufen ist keine Differenzierung der Gewebemorphologie mehr möglich. Um dennoch die Unterscheidung von Tumorbereich, Infiltrationszonen und Nekrosenzonen zu ermöglichen, werden die densitometrisch zu analysierenden Gewebeschnitte zuvor mit den zugehörigen H/E-Präparaten verglichen.

Insgesamt wurden 95 Gliome, 20 Hirntumore anderer Histologie und 9 Gewebeproben von Autopsiegewebe des Gehirns mit getrennter Erfassung von grauer und weißer Substanz untersucht.

#### *5.3.1. NCAM-140 in Autopsiegewebe*

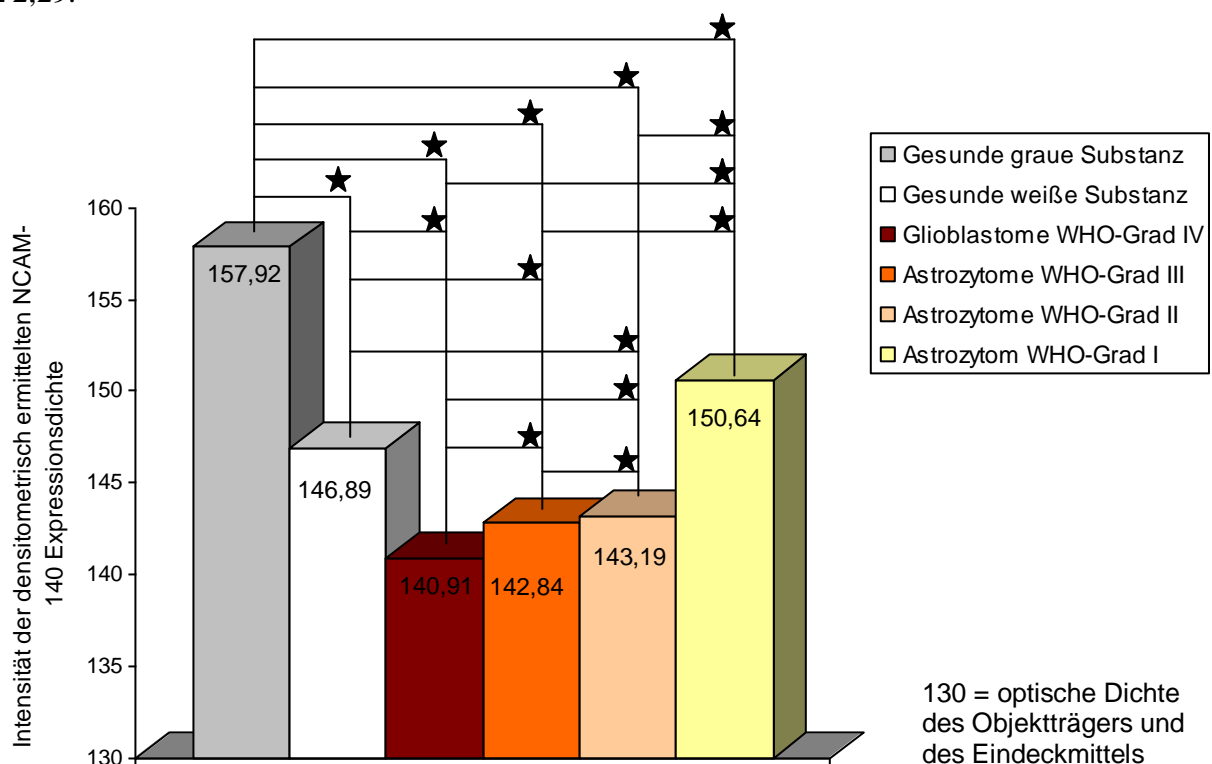
Die gesunde graue Substanz war das am stärksten NCAM-140-positivste Gewebe. Es konnten zu allen anderen untersuchten Geweben statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  mit  $<0,05$  angenommen wurde. Die untersuchte weiße Substanz zeigte erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede zu Astrozytomen vom WHO-Grad I, Oligoastrozytomen vom WHO-Grad II sowie Oligodendrogliomen vom WHO-Grad II. Gegenüber allen anderen Geweben ist gesunde weiße Substanz signifikant NCAM-140-positiver.

#### *5.3.2. NCAM-140 in Gliomen*

Bei der densitometrischen Auswertung und der darauf folgenden statistischen Analyse wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gliomen festgestellt. Dabei betrug die angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ . Es wurde jedoch darauf verzichtet die Tumore, die auch lichtmikroskopisch ausgeschlossen wurden in die statistische Auswertung aufzunehmen, da aufgrund der geringen Fallzahl ein korrektes statistisches Ergebnis nicht möglich war. Die Signifikanztestung mittels Mann-Whitney-Test ergab signifikante

Unterschiede zwischen der grauen Substanz und allen untersuchten Gliomentitäten, wie bereits auch makroskopisch und mikroskopisch festgestellt werden konnte.

Glioblastome vom WHO-Grad IV exprimierten signifikant weniger NCAM-140 ( $140,91 \pm 4,16$ ) als die graue und die weiße Substanz von Autopsiegewebe und als Astrozytome der WHO-Grade III, II und I (Abbildung 29). Signifikante Unterschiede der NCAM-140-Expression konnten auch innerhalb der Gruppe der Astrozytome densitometrisch festgestellt werden. Dabei wiesen die Astrozytome vom WHO-Grad I mit einer mittleren densitometrischen Dichte von  $150,64 \pm 2,63$  deutlich höhere Werte auf als die Astrozytome vom WHO-Grad II mit  $143,17 \pm 4,67$  und als die Astrozytome vom WHO-Grad III mit  $142,84 \pm 2,29$ .

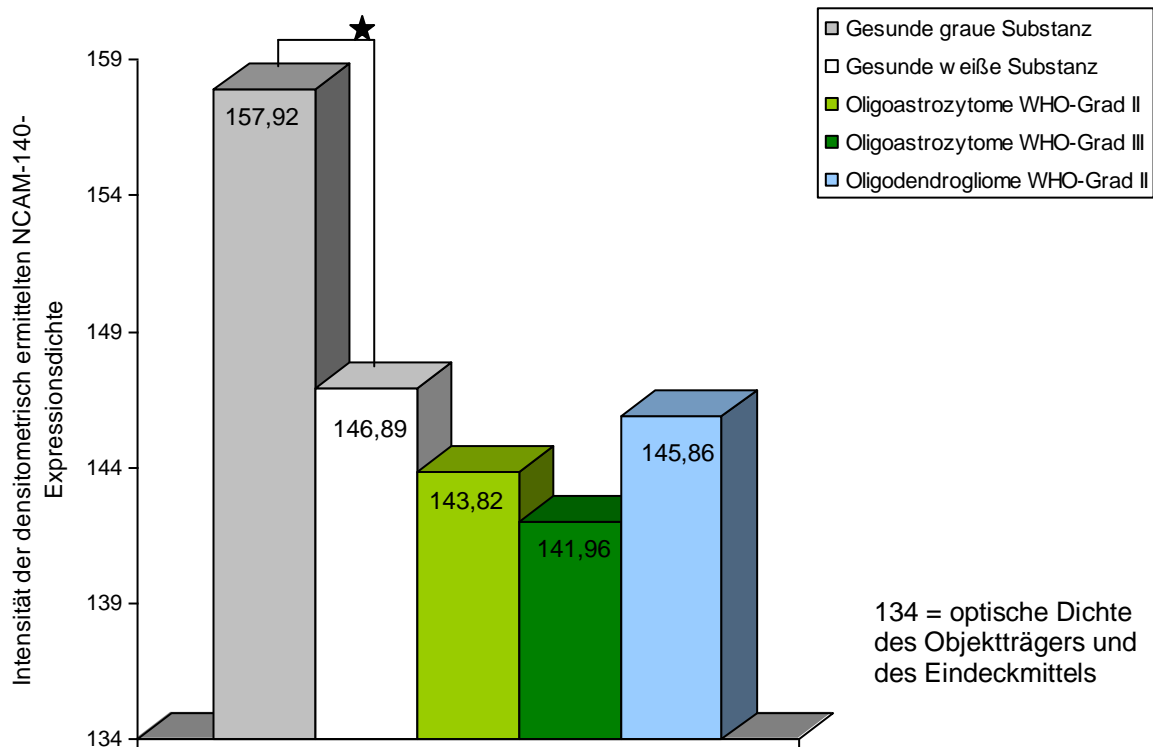


**Abbildung 29: Densitometrisch ermittelte Expressionsdichte von NCAM-140 auf humanen Astrozytomen und Glioblastomen im Vergleich zu Hirngewebe aus Autopsieproben**

Mit steigendem WHO-Grad nimmt die NCAM-140-Expression ab. Die signifikanten Unterschiede sind mit ★ gekennzeichnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  betrug  $<0,05$ . Statistisch belegte NCAM-140 Unterschiede wurden zwischen grauer und weißer Substanz, Glioblastomen WHO-Grad IV sowie Astrozytomen WHO-Grad III, II und I nachgewiesen. Die Unterschiede in der NCAM-140-Expression von Astrozytomen WHO-Grad I, II und III waren ebenfalls statistisch signifikant. Die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Gesunde graue Substanz exprimiert mehr NCAM-140 als Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie als Oligodendrogliome vom WHO-Grad II. Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Tumore wurde auf eine Signifikanztestung verzichtet. Das Balkendiagramm der Abbildung 30 zeigt die densitometrischen Expressionswerte der Oligoastrozytome der WHO-

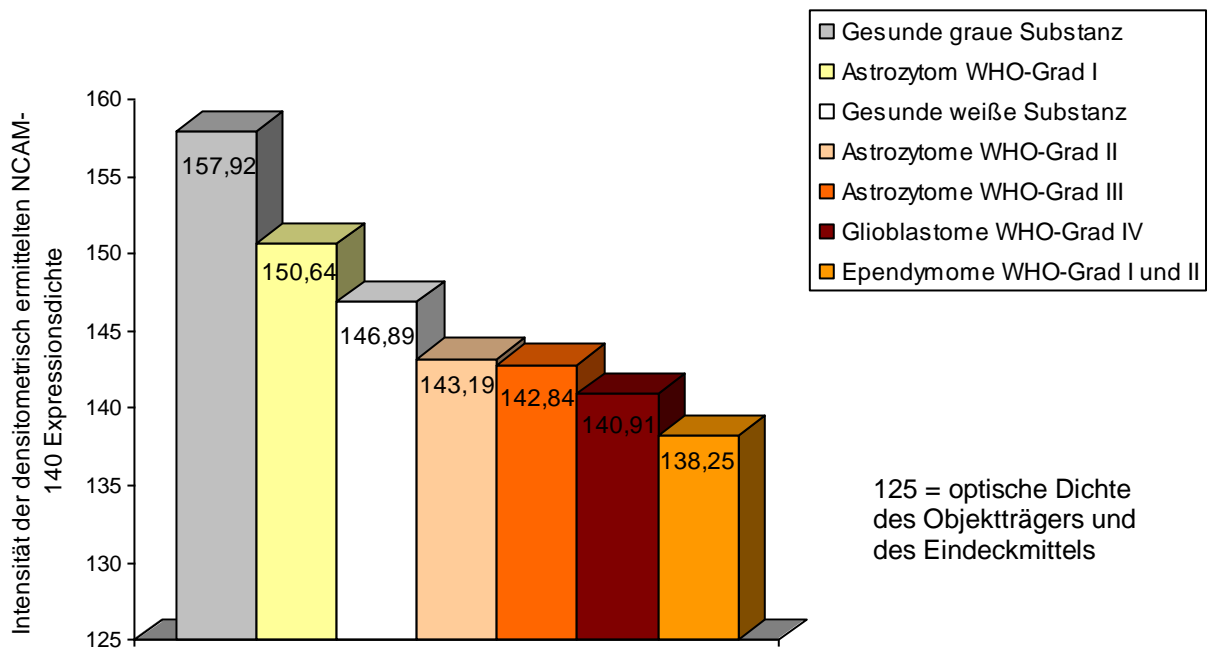
Grade II und III, der Oligodendrogliome vom WHO-Grad II sowie der gesunden grauen und weißen Substanz aus Autopsiegewebe.



**Abbildung 30: Densitometrisch ermittelte Expressionsdichte von NCAM-140 auf humanen Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III sowie Oligodendrogliomen WHO-Grad II.**

Statistisch signifikante Unterschiede sind mit ★ gekennzeichnet. Gesunde graue Hirnsubstanz ist gegenüber weißer Substanz, Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III sowie Oligodendrogliomen WHO-Grad II wesentlich NCAM-140 positiver. Weitere signifikante Unterschiede in den NCAM-140 Immunreaktivitäten sind aufgrund der geringen Fallzahlen dieser Tumore nicht möglich. Die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Die untersuchten Ependymome der WHO-Grade I und II zeigten eine geringe NCAM-140-Reaktivität mit einer mittleren densitometrischen Dichte von  $138,25 \pm 4,67$ . Unterschiede in der NCAM-140-Expression zeigten sich im Vergleich zu den Astrozytomen vom WHO-Grad I mit  $150,64 \pm 2,53$  und zu den Astrozytomen vom WHO-Grad II mit  $143,19 \pm 4,67$ . Gesunde graue Substanz von Autopsiegewebe ist mit einer densitometrischen Dichte von  $157,92 \pm 4,09$  deutlich NCAM-140-positiver als die Ependymome der WHO-Grade I und II. Glioblastome vom WHO-Grad IV Astrozytomen vom WHO-Grad III waren ebenfalls gering NCAM-140-positiver. Da die Ependymome mit einer Fallzahl von vier Vertretern sehr wenige waren, unterblieb hier eine Signifikanztestung, da verwertbare Ergebnisse nicht zu erwarten waren. Das Balkendiagramm der Abbildung 31 verdeutlicht die Ergebnisse.

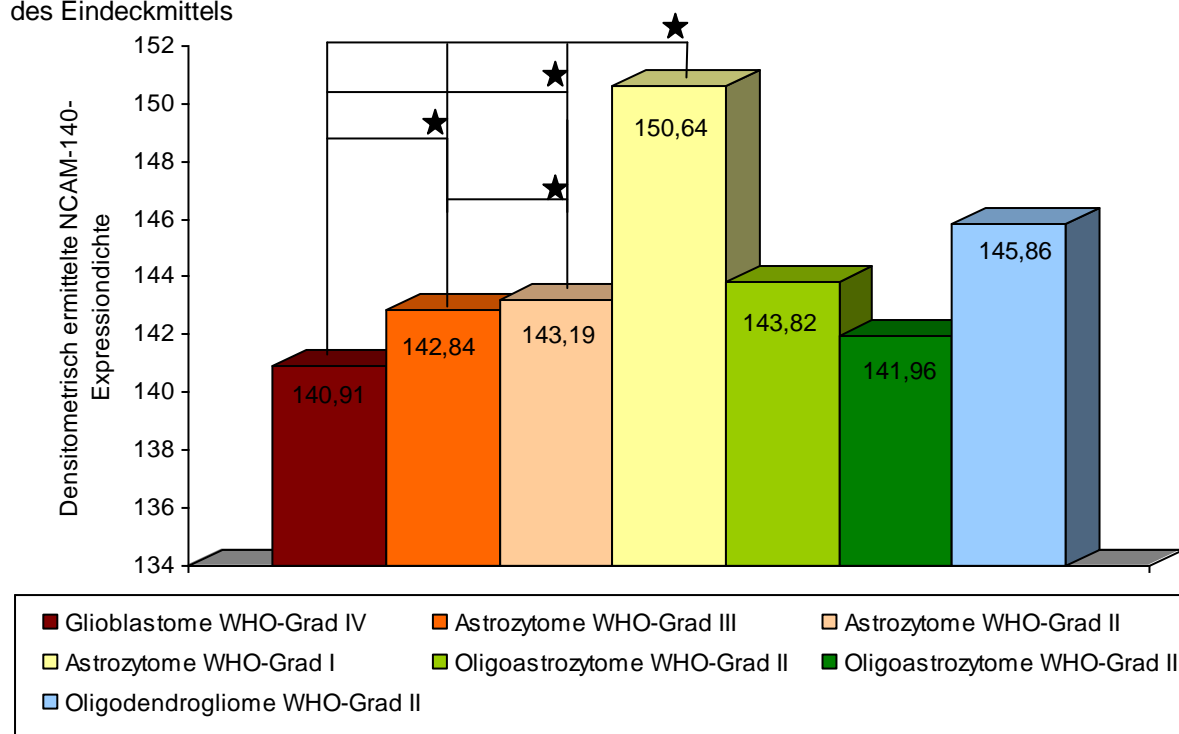


**Abbildung 31: Darstellung der Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den untersuchten Gliomen und gesunder grauer und weißer Substanz**

Ependymome der WHO-Grade I und II zeigten Unterschiede in der NCAM-140-Expression im Vergleich zu den Astrozytomen vom WHO-Grad I, den Astrozytomen vom WHO-Grad II, den Astrozytomen vom WHO-Grad III, zu Glioblastomen vom WHO-Grad IV sowie zu gesunder grauer und weißer Substanz aus Autopsieproben. Aufgrund der geringen untersuchten Fallzahl der Ependymome WHO-Grad I und II erfolgte hier keine Signifikanztestung. Auf die Darstellung der restlichen signifikanten Unterschiede wurde in dieser Abbildung verzichtet. Die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Unterschiede in der NCAM-140-Expression konnten zwischen Glioblastomen WHO-Grad IV und den Oligoastrozytomen der WHO-Grade II und III sowie zu den Oligodendrogliomen WHO-Grad II festgestellt werden. Astrozytome vom WHO-Grade I exprimierten deutlich mehr NCAM-140 im Vergleich zu den oligoastrozytären Mischgliomen. Zu den Astrozytomen der WHO-Grad II und III unterschieden sich die astrozytären Mischgliome nur in einer geringen NCAM-140-Expression. Eine Signifikanztestung wurde wie zuvor in der lichtmikroskopischen Auswertung aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt. In dem Balkendiagramm der Abbildung 32 sind die densitometrisch ermittelten NCAM-140-Expressionswerte der Glioblastome vom WHO-Grad IV, der Astrozytome der WHO-Grade I, II und III, der Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie die Oligodendrogliome WHO-Grad II dargestellt.

134 = optische Dichte  
des Objektträgers und  
des Eindeckmittels



**Abbildung 32: Darstellung der signifikanten Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den untersuchten Gliomen.**

Statistisch signifikante Unterschiede sind mit ★ gekennzeichnet. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III sowie Oligodendrogliome vom WHO-Grad II nicht in die Signifikanztestung mit aufgenommen.

In Tabelle 10 sind die untersuchten Gliome sowie gesunde graue und weiße Substanz aus Autopsiegewebe hinsichtlich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrisch ermittelten NCAM-140-Immunreaktivität zusammenfassend aufgelistet.

Tumore	N	Mittelwerte ± Standardabweichung
Glioblastome WHO-GradIV	46	140,91 ± 4,16
Astrozytome WHO-Grad III	15	142,84 ± 2,29
Astrozytome WHO-Grad II	16	143,19 ± 4,67
Astrozytome WHO-Grad I	4	150,64 ± 2,63
Oligoastrozytom WHO-Grad III	2	141,96 ± 1,32
Oligoastrozytome WHO-Grad II	2	143,82 ± 1,79
Oligodendrogliome WHO-Grad III	1	142,00 ± 1,31
Oligodendrogliome WHO-Grad II	3	145,86 ± 3,42
Ependymom WHO-Grad II	3	140,86 ± 3,99
Ependymom WHO-Grad I	1	135,63 ± 1,14
Summe	93	
Graue Substanz	9	157,92 ± 4,09
Weiße Substanz	9	146,89 ± 3,76
Summe	18	

**Tabelle 10: Übersicht der densitometrisch ermittelten Werte der NCAM-140-Immunreaktivität.**



Die densitometrisch ermittelten Werte wurden durch den Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet und mit den Werten der Gliome und denen des gesunden Gewebes verglichen und auf signifikante Unterschiede der NCAM-140-Expression geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tumore	GB	A III	A II	A I	OA II	OA III	OD II	E I+II	NG	GS	WS
GB											
A III	0,000										
A II	0,000	0,040									
A I	0,000	0,006	0,005								
OA II											
OA III											
OD II											
E I+II											
NG	0,000	0,000	0,000	0,000							
GS	0,000	0,000	0,000	0,003					0,000		
WS	0,000	0,002	0,023	0,330					0,000	0,000	

**Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse der statistischen Auswertung der densitometrischen Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität.**

Rot markierte Kästchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gliomen, anderen Hirntumoren und gesundem Gewebe. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  ( $<0,05$ ) ist angegeben.

GB : Glioblastom WHO-Grad IV  
A III : Astrozytom WHO-Grad III  
A II : Astrozytom WHO-Grad II  
A I : Astrozytom WHO-Grad I

OA II : Oligoastrozytom WHO-Grad II  
OA III : Oligoastrozytom WHO-Grad III  
OD II : Oligodendrogliom WHO-Grad II  
E I+II : Ependymome WHO-Grad I+II

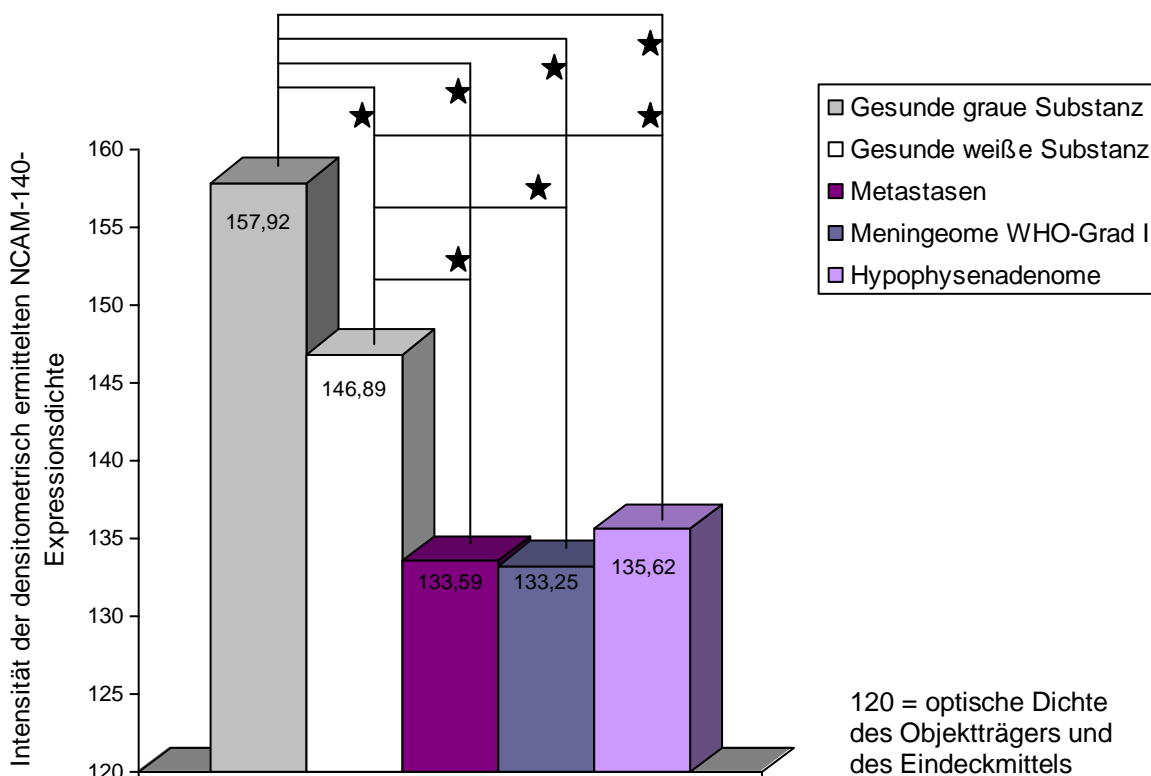
NG : Nicht Gliome  
GS : Graue Substanz  
WS : Weiße Substanz

### 5.3.2. NCAM-140 in anderen Hirntumoren

Um die NCAM-140-Expression anderer Hirntumore zu ermitteln, wurden sieben Hirnmetastasen, sieben Meningeome WHO-Grad I und vier Hypophysenadenome analysiert. 18 Gewebeproben der grauen und weißen Substanz aus Autopsieproben dienten als Kontrollgewebe (siehe Tabelle 12 auf Seite 62).

Insgesamt wiesen alle untersuchten Gewebeproben der anderen Hirntumore eine sehr niedrige bis keine erfassbare NCAM-140-Expression auf. Gegenüber der grauen und weißen Substanz aus Autopsiegewebe exprimierten die Metastasen, Hypophysenadenome sowie die Meningeome signifikant weniger NCAM-140.

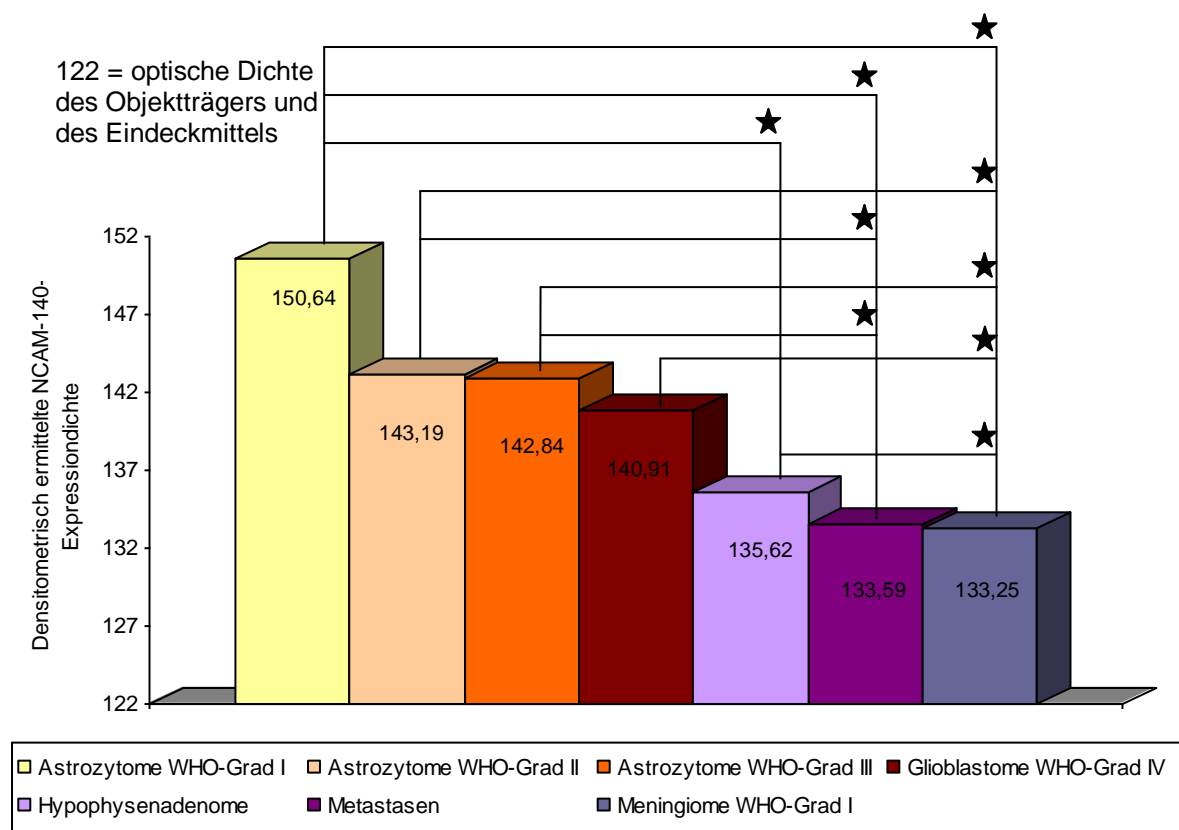
Die densitometrisch ermittelte NCAM-140-Expression der Metastasen betrug  $133,59 \pm 3,35$ . Damit konnte ein signifikanter Unterschied zur grauen und weißen Substanz aus Autopsiegewebe festgestellt werden. Weitere statistische Unterschiede bestanden im Vergleich der grauen und weißen Kontrollsubstanz mit Meningeomen WHO-Grad I mit einem Mittelwert von C und Hypophysenadenomen mit einem densitometrischen Mittelwert von  $135,62 \pm 5,70$ . Im folgenden Balkendiagramm der Abbildung 33 sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der densitometrisch festgestellten NCAM-140-Expressionsdichte von Hirnmetastasen, Meningeomen WHO-Grad I und Hypophysenadenomen.**

Alle drei Tumorkategorien weisen jeweils zur gesunden grauen und weißen Substanz eine statistisch bewiesene signifikante Unterscheidung hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität (siehe ★) auf.

Im Vergleich der nicht gliomatösen Hirntumore mit den Gliomen ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede für NCAM-140. Meningeome WHO-Grad I ( $133,59 \pm 3,35$ ) und Hirnmetastasen ( $133,59 \pm 3,35$ ) zeigten gegenüber Glioblastomen WHO-Grad IV ( $140,91 \pm 4,16$ ), Astrozytomen der WHO-Grade I ( $150,64 \pm 2,63$ ), II ( $143,19 \pm 4,67$ ) und III ( $142,84 \pm 2,29$ ), ebenfalls eine signifikante geringere NCAM-140-Immunreaktivität. Hypophysenadenome wiesen einen statistischen Unterschied in der NCAM-140-Expression gegenüber den Astrozytomen WHO-Grad I auf, da Hypophysenadenome mit einem densitometrischen Mittelwert von  $135,62 \pm 5,70$  NCAM-140-positiver waren als die anderen untersuchten Hirntumore. Zu allen anderen Gliomentitäten fanden sich hier keine signifikanten Unterschiede. Auch im Vergleich zu den Oligoastrozytomen der WHO-Grade II und III fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Statistische Unterschiede in der NCAM-140-Expression innerhalb der Gruppe der nichtgliomatösen Hirntumore konnten nicht festgestellt werden. Das Balkendiagramm der Abbildung 34 veranschaulicht diese Zusammenhänge nochmals deutlich. Die Standardabweichungen sind mit der Irrtumswahrscheinlichkeit in der Tabelle 12 auf Seite 62 dargestellt.



**Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse der densitometrisch festgestellten NCAM-140-Expressionsdichte von Metastasen, Meningeomen WHO-Grad I und Hypophysenadenome.**

Statistisch signifikante Unterschiede sind mit ★ gekennzeichnet. Meningeome WHO-Grad I und Metastasen unterscheiden sich zu Glioblastomen WHO-Grad IV und Astrozytomen WHO-Grad I, II und III signifikant. Hypophysenadenome weisen lediglich zu Astrozytomen vom WHO-Grad I eine statistisch belegte Unterscheidung hinsichtlich der NCAM-140 Expression auf.

In Tabelle 12 sind die untersuchten Hirnmetastasen, Meningeome WHO-Grad I, Hypophysenadenome sowie Kontrollproben der grauen und weißen Substanz aus Autopsiegewebe hinsichtlich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen der densitometrisch ermittelten NCAM-140-Immunoreaktivität zusammenfassend dargestellt.

Tumore	N	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
Meningeome WHO-Grad I	7	133,25 $\pm$ 0,96
Metastasen	7	133,59 $\pm$ 3,35
Hypophysenadenome	4	135,62 $\pm$ 5,70
Summe	18	
Weißer Substanz	9	146,89 $\pm$ 3,76
Graue Substanz	9	157,92 $\pm$ 4,09
Summe	18	

**Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse der densitometrischen Analyse der NCAM-140-Expression der zusätzlich untersuchten Hirntumore.**

Die Kreuztabelle 13 auf Seite 62 veranschaulicht die Gewebepaare, die in ihrer NCAM-Expressionsdichte signifikante Unterschiede aufweisen auf einen Blick. Dabei sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten die mittels Mann-Whitney-Test ermittelt worden mit angegeben. Die als signifikant eingestuften Unterschiede sind rot unterlegt.

Tumore	GB	A III	A II	A I	OA II	OA III	OD II	MI	MTS	HA	GS	WS
GB												
A III	0,000											
A II	0,000	0,040										
A I	0,000	0,006	0,005									
OA II												
OA III												
OD II												
MI	0,000	0,000	0,001	0,006								
MTS	0,001	0,000	0,001	0,006				0,318				
HA	0,090	0,080	0,080	0,029				0,927	0,412			
GS	0,000	0,000	0,000	0,003				0,000	0,000	0,003		
WS	0,000	0,002	0,023	0,330				0,000	0,000	0,020	0,000	

**Tabelle 13: Übersicht der Ergebnisse der statistischen Auswertung der densitometrischen Analyse der NCAM-140-Immunreaktivität.**

Rot markierte Kästchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gliomen, Meningeomen WHO-Grad I, Metastasen, Hypophysenadenomen und gesundem Gewebe. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist ebenfalls mit angegeben.

GB : Glioblastom WHO-Grad IV  
A III : Astrozytom WHO-Grad III  
A II : Astrozytom WHO-Grad II  
A I : Astrozytom WHO-Grad I

OA II : Oligoastrozytom WHO-Grad II  
OA III : Oligoastrozytom WHO-Grad III  
OD II : Oligodendrogliom WHO-Grad II  
MI : Meningeome WHO-Grad I

MTS : Metastasen  
HA : Hypophysenadenom  
GS : Graue Substanz  
WS : Weiße Substanz

## 5.4 Visualisierung der Tumorgrenze in humanen Glioblastomen vom WHO-Grad IV anhand der NCAM-140-Negativität

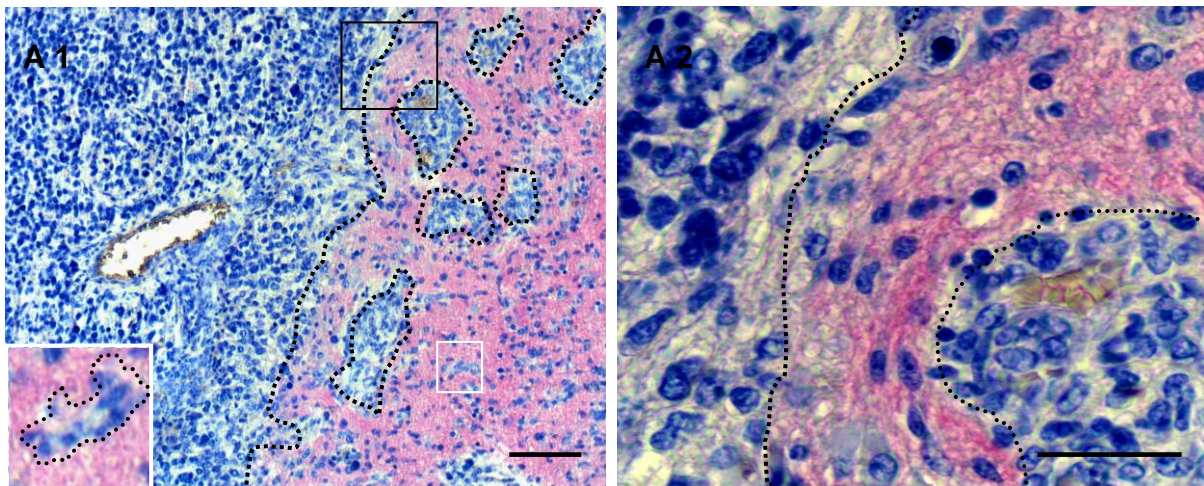
### 5.4.1. NCAM-140-Intensitätsunterschiede in Bezug zur Tumorgrenze

67 % der untersuchten Glioblastome (n=30) waren lichtmikroskopisch NCAM-140-negativ, wie in den vorbestehenden Kapiteln ausgeführt wurde. Es ließ sich bei diesen Tumoren keine NCAM-140-Immunreaktivität in Form eines roten Niederschlags nachweisen.

Während der Lichtmikroskopie dieser Glioblastome wurde beobachtet, dass in der unmittelbaren Umgebung von 25 dieser Glioblastome vom WHO-Grad IV kräftig NCAM-140-positives Gewebe dargestellt werden konnte. Dieses kräftig NCAM-140-positive Gewebe zeichnete sich durch eine massiv geringere Zelldichte, fehlende Mitosen und keine nachweisbaren Blutgefäße auf, wobei typische glomeruloide Gefäßstrukturen gar nicht beobachtet werden konnten.

Letztlich ergab die histopathologische Diagnose, dass es sich bei diesem Gewebe um peritumorales Hirngewebe handelt.

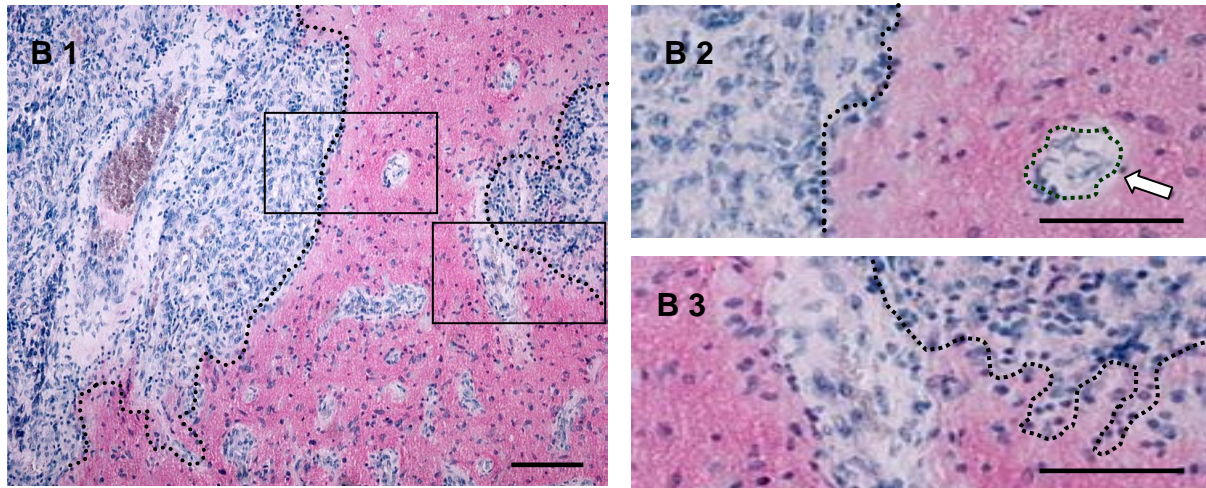
Dieser durch Zufall entdeckte Befund, ließ sich allerdings nur bei völliger NCAM-140-Negativität der Glioblastome nachweisen. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen zwei typische Vertreter, die dieses Ergebnis verdeutlichen.



**Abbildung 35: NCAM-140-negative Tumorbereiche von Glioblastomen WHO-Grad IV können von der NCAM-140-positiven Umgebung abgegrenzt werden.**

A1 zeigt den Grenzbereich in jeweils einem repräsentativen NCAM/H Schnittpräparat eines Glioblastoms vom WHO-Grad IV. Es ist eine scharfe Begrenzung zu erkennen, die in A2 nochmals vergrößert dargestellt wurde. Einzelne NCAM-negative Tumorzellnester lassen sich noch nicht mit letzter Sicherheit abgrenzen. Es können jedoch Tumorzellnester und die Gesamtheit der Invasionszone beurteilt werden. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

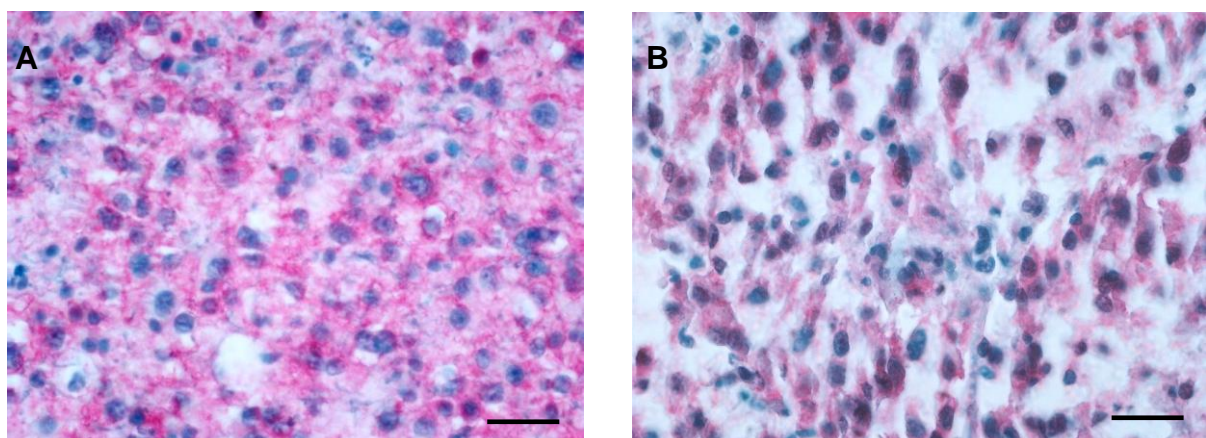




**Abbildung 36: NCAM-140-negative Tumorgrenze bei einem anderen Vertreter der Glioblastome vom WHO-Grad IV**

B1 zeigt den Grenzbereich in einem repräsentativen NCAM/H Schnittpräparat eines Glioblastoms. Es ist eine scharfe Abgrenzung zum peritumoralen Gewebe zu erkennen, die in B2 und B3 nochmals vergrößert dargestellt wurde. Der Pfeil in B2 markiert ein Blutgefäß. B3 stellt die Infiltrationszone mit einer noch gering vorhandenen NCAM-140 Rest-Immunreaktivität dar. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Bei niedriggradigen Gliomen konnte durch die vorhandene NCAM-140-Positivität keine deutliche Demarkierung vom umgebenden Hirngewebe beobachtet werden. Auch bei Glioblastomen WHO-Grad IV, die in Ausnahmen stärker NCAM-140-positiv waren, konnte keine Trennung zwischen tumorösem und peritumoralem Gewebe festgestellt werden. Die Abbildung 37 stellt typische Vertreter der Astrozytome WHO-Grad II und III dar. Darin zeigt sich eine diffuse Infiltration des Tumors in das umgebende Hirngewebe. Eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumor und peritumoralem Hirngewebe ist nicht möglich.



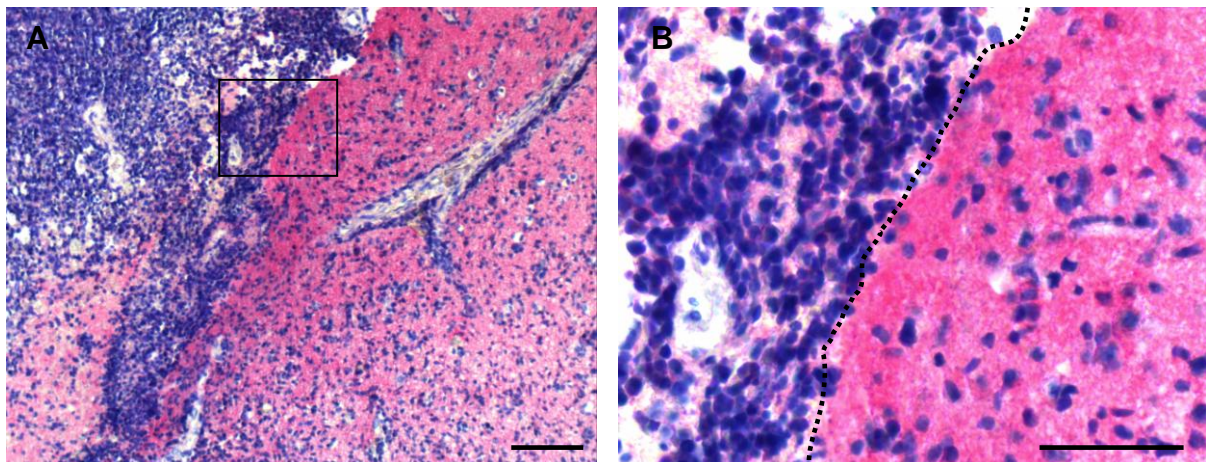
**Abbildung 37: Astrozytome der WHO-Grade II und III**

Bei niedriggradigen Gliomen konnte keine exakte Trennung zwischen tumorös infiltriertem und peritumoralem Hirngewebe festgestellt werden, wie dieses am Beispiel eines Astrozytoms WHO-Grad II (Bild A) und eines Astrozytoms WHO-Grad III (Bild B) dargestellt ist. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

#### 5.4.2. Visualisierung verschiedener Invasionsmuster multiformer Glioblastome

Aufgrund der deutlichen NCAM-140-Negativität war bei den Glioblastomen nun auch eine grobe Bewertung der Invasionszone dieser Tumore möglich.

Bei 25 der 45 untersuchten Glioblastome vom WHO-Grad IV war auf den Gewebeschnitten peritumorales Gewebe vorhanden. Diese 25 Glioblastome waren alle NCAM-140-negativ. Dadurch gelang es bei diesen Glioblastomen, das peritumorale Hirngewebe zu beurteilen und die Gliominvasionszone zu analysieren. Bei 8 Vertretern dieser Tumore zeigte sich eine unmittelbare Gliominvasionszone. Die folgende Abbildung verdeutlicht dieses Ergebnis.

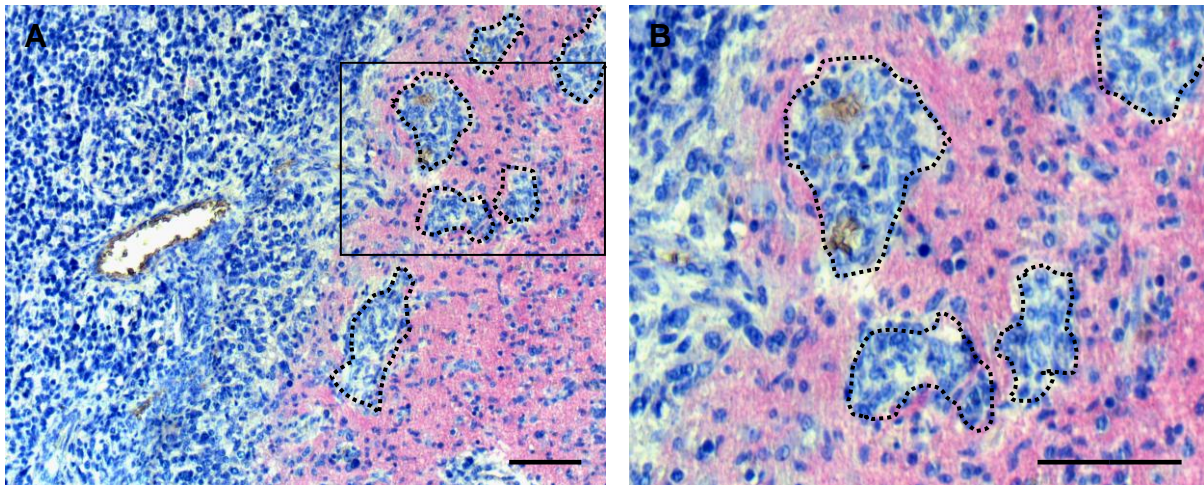


**Abbildung 38: Darstellung der Glioblastom-Invasionszone**

Von 45 untersuchten Glioblastomproben zeigten 25 Präparate peritumorales Hirngewebe. Bei 8 Vertretern konnte eine unmittelbare Gliominvasionszone (Bild A) dargestellt werden. In Bild B ist ein relevanter Ausschnitt nochmals vergrößert dargestellt. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Bei zwei Vertretern dieser 25 vollständig NCAM-140-negativen Glioblastome vom WHO-Grad IV konnte man im Bereich der Gliominvasionszone eine Tumorabsiedlung in Form von Tumorzellnestern beobachten. Diese invadierenden Zellnester sind NCAM-140-negativ und liegen inselförmig innerhalb des NCAM-140-positiven peritumoralen Gewebes. In der Abbildung 39 sind diese Tumorzellnester dargestellt.

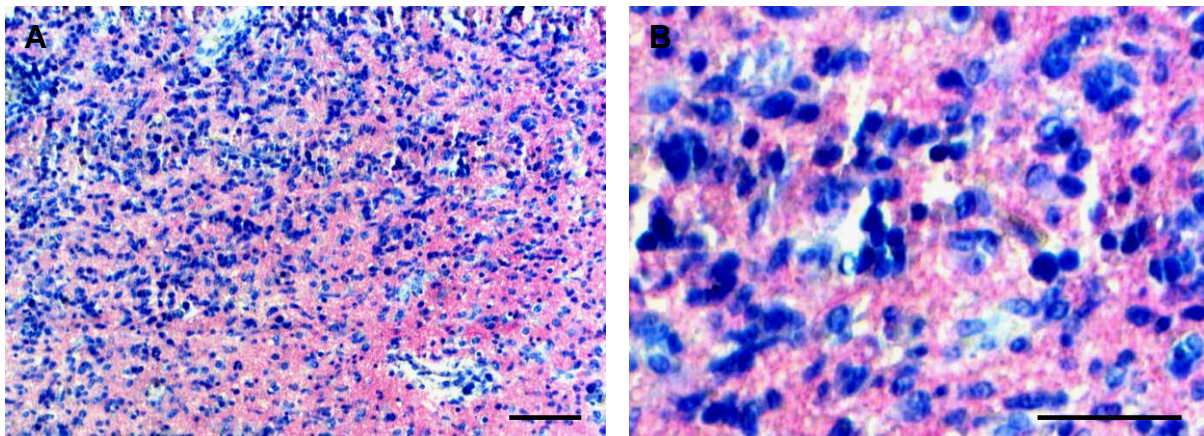




**Abbildung 39: Zellnestförmige Gliominvasion eines Glioblastoms WHO-Grad IV in das peritumorale Gewebe**

Bei zwei Glioblastomen vom WHO-Grad IV konnte neben einer Gliominvasionszone eine zellnestförmige Tumorabsiedlung nachgewiesen werden (Bild A). Die Tumorzellnester liegen innerhalb des peritumoralen Gewebes und sind NCAM-140-negativ. In Bild B sind diese Bereiche nochmals vergrößert dargestellt. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Bei 15 der 45 untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV zeigte sich eine eher diffuse Infiltration des Tumors in das peritumorale Gewebe. Diese Vertreter der Glioblastome vom WHO-Grad IV waren zwar NCAM-140-negativ, eine scharfe Tumorgrenze konnte aufgrund der diffusen Infiltration nicht nachgewiesen werden. Abbildung 40 veranschaulicht dieses Ergebnis.

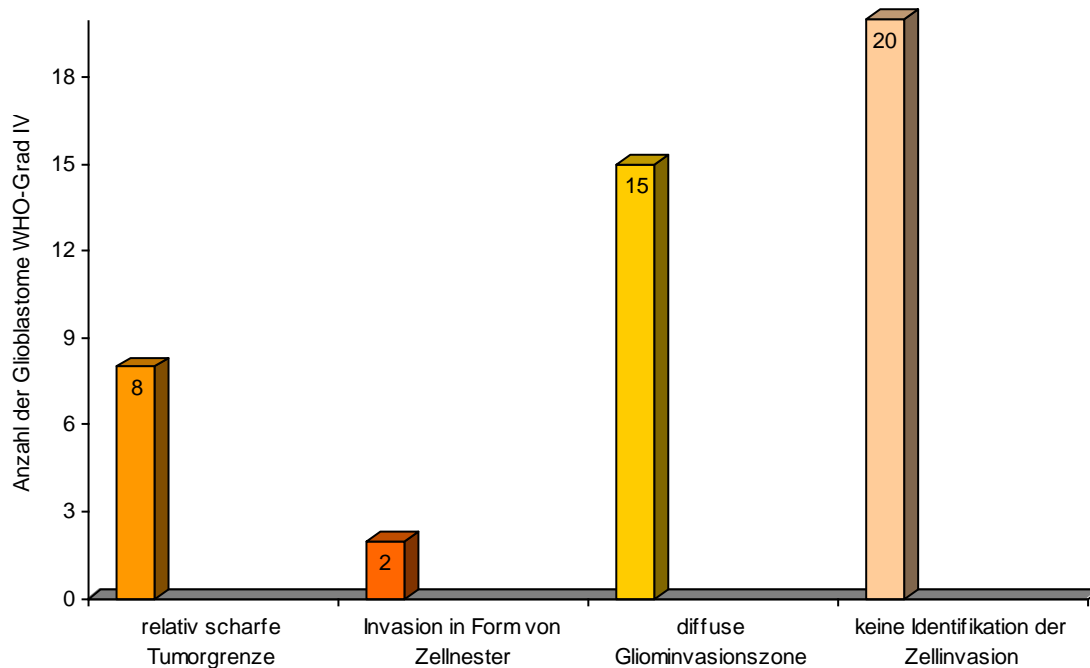


**Abbildung 40: Diffuse Infiltration eines Glioblastoms WHO-Grad IV in das peritumorale Hirngewebe.**

Bei 15 Glioblastomen vom WHO-Grad IV konnte keine scharfe Tumorgrenze beobachtet werden. Vielmehr kam es zu einer diffusen Infiltration (Bild A). Eine eindeutige Trennung zwischen peritumoralen Gewebe und eigentlichem Tumor war nicht möglich. Bild B zeigt eine Vergrößerung dieser Invasionsform. Die Balken entsprechen jeweils einer Länge von 50µm.

Bei 45 % der Glioblastome WHO-Grad IV (n=20) war keine Identifikation der Zellinvasion möglich, da kein peritumorales Gewebe auf den untersuchten Gewebeschnitten vorlag.

Im folgenden Diagramm sind die einzelnen unterschiedlichen Ergebnisse noch einmal zusammengefasst.



**Abbildung 41: Mikroskopische Invasionsformen der untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV**

Bei 25 der untersuchten 45 Glioblastome vom WHO-Grad IV konnte auf dem Objektträger peritumorales Gewebe nachgewiesen werden. 10 dieser Glioblastome zeigten eine unmittelbare Grenzzone zwischen Tumor und peritumoralem Gewebe. In 2 dieser 10 untersuchten Glioblastome konnte zusätzlich eine Invasion in Form von Zellnestern beobachtet werden. 15 Vertreter zeigten eine diffuse Ausbreitung des Tumors in das peritumorale Gewebe. Bei dem Rest der untersuchten Glioblastome vom WHO-Grad IV konnte kein peritumorales Gewebe gesichert werden und somit keine Identifikation der Invasionszone erfolgen.

## 6. Diskussion

### 6.1. Einführung

Das Neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) ist ein zellmembranständiges Glykoprotein, welches Zell-Zell-Kontakte sowie Kontakte zwischen Zellen und Matrixbestandteilen vermittelt. Während vor einiger Zeit noch angenommen wurde, dass NCAM nur als einfacher Vermittler der Zelladhäsion dient, weiß man inzwischen, dass es auch bei der intrazellulären Signalübertragung eine wichtige biologische Rolle spielt und als eine Art Rezeptormolekül fungiert (Crossin und Krushel 2000, Ronn et al. 1998).

Durch diese Interaktionen moduliert es verschiedene biologische Phänomene, einschließlich der zellulären Adhäsion, synaptischen Plastizität, Migration, Proliferation und Differenzierung von Neuronen, Gliazellen und neuronalen Stammzellen (Walmod et al. 2004, Kiss et al. 2001). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass NCAM (200-250 kDa) die Proliferation von Astrozyten und hippokampalen Progenitorzellen der Ratte *in vitro* und *in situ* hemmt (Krushel et al. 1998, Sporns et al. 1995, Amoureux et al. 2000).

Darüber hinaus gab es Berichte über einen anti-invasiven Effekt von NCAM-140 auf Ratten-Gliomzellen (Gratsa et al. 1997, Edvardsen et al. 1993, Prag et al. 2002).

NCAM kann als einziges neurales Zelladhäsionsmolekül durch Anhängen eines großen, negativ geladenen Zuckermoleküls, der so genannten Polysialylsäure (PSA) modifiziert werden. Durch dieses PSA-NCAM ist die Grundlage für Modulationsprozesse im Neokortex, im Limbischen System oder der Amygdala gegeben. (Ronn et al. 1998, Kiss et al. 2001). PSA-NCAM ist somit durch eine lockerere Zelladhäsion charakterisiert. Es kommt bei allen Prozessen der embryonalen Proliferation und Migration vor, aber auch im adulten Gehirn in Arealen erhöhter zellulärer Plastizität. Ziel der lockeren Zelladhäsion ist eine zügige Herauslösung der Zellen aus dem Verband im Rahmen plastischer Vorgänge (Kiss et al. 2001).

Um die NCAM-140-Expression in humanen Gliomen zu untersuchen, wurden 95 humane Gliome unterschiedlicher Malignität und Histologie, Vergleichsgewebe aus der grauen und weißen Hirnsubstanz von 9 Autopsieproben sowie 18 intrakranielle Tumore anderer Histologien immunhistochemisch mit einem polyklonalen Primärantikörper gegen humanes NCAM-140 analysiert. Die Intensität der NCAM-140-Immunfärbung, die in einem standardisierten Färbeprozess den Grad der NCAM-140-Expression entspricht, wurde subjektiv makroskopisch und lichtmikroskopisch bewertet und objektiv densitometrisch gemessen. Nach statistischer Erfassung erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede der NCAM-140-Expression innerhalb der verschiedenen Gewebetypen.

### *6.1.1. Verwendung von Autopsiegewebe als tumorfreies Kontrollgewebe*

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gewebeschnitten handelte es sich ausschließlich um Autopsiegewebe des Pathologischen Instituts in Jena. Jedes Gewebe ist nach dem Sistieren der Zellatmung durch eine stetig fortschreitende Autolyse der einzelnen Proteine gekennzeichnet, in deren Verlauf es zum Zellzerfall und zum Untergang der Proteine kommt (Schäfer und Riede 2001). Um möglichst wenig primäre Zellstruktur und Zellkomponenten durch Autolyse zu verlieren, wurden alle von uns untersuchten Gewebeproben nach pathologischer Aufarbeitung zügig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Man kann davon ausgehen, dass es bis zum Einbetten der Präparate zum Verlust einiger Proteine gekommen ist. Das Molekül NCAM-140 konnte jedoch in allen Auswertungsmethoden als signifikant erhöht gegenüber allen Tumorproben nachgewiesen werden. Es unterlag deshalb nachweislich nicht einer experimentell relevanten Autolyse. Daher ist davon auszugehen, dass Autopsiegewebe durchaus als tumorfreies Kontrollgewebe im Rahmen dieser Studie verwendet werden kann.

## **6.2. Bewertung der genutzten Analyseverfahren**

### *6.2.1. Makroskopische Analyse*

Die makroskopische Analyse einer NCAM-Expression in Form eines roten Niederschlages in Hirntumorpräparaten ist nach unserem Wissen noch nicht beschrieben. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man mit der Methode eine eventuelle intraoperative Nutzung prüfen kann. Ein weiterer Vorteil liegt in der schnellen und einfachen Einsetzbarkeit der NCAM-140-Färbung, um möglichst zügig einen groben Überblick zu erhalten. Nachteilig ist die fest definierte Vergrößerung, die durch das menschliche Auge vorgegeben wird. Veränderungen auf zellulärem Level, sowie eine unterschiedliche zelluläre Expressionen von bestimmten Zellmarkern können hier nicht unterschieden werden, was die Sensitivität dieser Methode vermindert. Diese Methode wurde jedoch einzig mit der Fragestellung einer eventuellen späteren Nutzung während neurochirurgischer Eingriffe eingesetzt und kann dafür in vollem Umfang genutzt werden, wie die spätere Diskussion der Ergebnisse beweisen wird.

### *6.2.2. Lichtmikroskopische Analyse*

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Immunreaktivität auf ein bestimmtes Antigen stellt ein gebräuchliches Verfahren in der biomedizinischen Forschung dar (Tews und Nissen 1998, Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999, Thies et al. 2001). Dabei müssen verschiedene Untersucher bei der Beurteilung von gleichen Gewebeproben unabhängig voneinander zu

einem vergleichbaren Ergebnis kommen. Dafür ist es wichtig, dass die Untersucher bei der Auswertung die genaue Tumorphistologie nicht kennen, damit die objektive Bewertung nicht beeinflusst wird.

Die Publikationen von Tews und Nissen, sowie Kleinschmidt-DeMasters et al. stellen zwei Beispielveröffentlichungen dieser Methode dar. Die Arbeitsgruppe um Tews untersuchte in 27 primären und in 17 sekundären Glioblastomen die Expression von NCAM und anderen Adhäsionsfaktoren. Hinsichtlich der Methodik ging Tews in ähnlicher Weise vor, allerdings wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der Epitope besitzt, die alle drei NCAM-Hauptisoformen (NCAM-120, -140, -180) erkannten. Die semiquantitative Analyse wurde modifiziert und zur statistischen Überprüfung der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Tews untersuchte in repräsentativen Tumorbereichen zwischen 1000 bis 10000 Tumorzellen mit bis zu 80-facher Vergrößerung. Dabei wurde eingeschätzt, wie viel Prozent der Zellen eine positive Immunreaktion aufwiesen. Die Immunpositivität wurde in fünf Grade eingeteilt. So konnte man sehen, ob es sich um eine negative (0), schwache (1), moderate (2), starke (3) oder sehr starke (4) Färbung handelte. Diese Einstufungen wurden vorab an einzelnen Beispielgewebeprobe festgelegt, so dass verschiedene Untersucher eine Skala für die Bewertung der Immunreaktivität nutzen konnten. Kleinschmidt-DeMasters bediente sich der gleichen Methode. Lediglich die prozentuale Einteilung wurde verändert. Auch von Thies et al. wurde dieses Verfahren verwendet. Hier wurde aber zusätzlich der Prozentsatz der Immunreaktivität mit einem der Stärke der Immunreaktivität zugeordneten Zahlenwert multipliziert und erfasst. Dieses Verfahren ermöglicht somit eine schnellere und vom Untersucher unabhängige Beurteilung der erfassten Färbestärke.

Im Gegensatz zur makroskopischen Analyse können durch verschiedene Vergrößerungen alle Veränderungen von Morphologie und Dichte auf zellulärem Niveau beschrieben werden.

### *6.2.3. Densitometrische Analyse*

Die Densitometrie ist in der experimentellen Forschung ein weit verbreitetes Auswertungsverfahren. Der entscheidende Vorteil gegenüber den anderen Methoden ist die Objektivität der erhaltenen Ergebnisse. Diese wird vor allem durch die vorherige Kalibrierung der Messinstrumente erreicht. Verschiedene Untersucher kommen hier unabhängig von dem zu untersuchenden Gewebe zu annähernd gleichen Ergebnissen. Das Analyseverfahren ist im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben.

Eine Vielzahl an wissenschaftlichen Publikationen gibt Anlass, sich auch für diese Methode der Auswertung zu entscheiden. Dabei steht insbesondere die quantitative Analyse von verschiedenen Oberflächenmolekülen im Vordergrund. Sawaya et al. 1996 untersuchte, welche Rolle Metalloproteinasen bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren spielen. Dabei bestimmte er mittels Densitometrie die quantitative Expression der Kollagenase Typ IV in humanen Gliomen und zog so Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten. Chakravarti et al. 2002 benutzte die densitometrische Analyse zur quantitativen Bestimmung von Survivin in humanen Gliomen. Dieses Protein verhindert die Apoptose von Tumorzellen und kann zur prognostischen Aussagen in Gliomen herangezogen werden.

Auch außerhalb des ZNS kommt die Densitometrie zum Einsatz. In Mammakarzinomen konnte densitometrisch ein Anstieg der Expression von CD146 und c-Met erfasst werden (Garcia et al. 2007).

Die Densitometrie bietet somit ein breites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten und ist ein Standardverfahren bei der Untersuchung von signifikanten Expressionsunterschieden von Antigenen in Tumoren.

In der vorliegenden Promotion wurde dieses Analyseverfahren dazu verwendet, um einerseits quantitative Bestimmungen von NCAM-140 vorzunehmen und um andererseits die erhaltenen Ergebnisse mit denen der makroskopischen und mikroskopischen Auswertung zu vergleichen. Dadurch können letztendlich beide subjektive Verfahren in ihrer Wertigkeit eingeordnet werden.

### **6.3. Ergebnisse der makroskopischen Auswertung**

#### *6.3.1. Gesunde graue Hirnsubstanz exprimiert gegenüber allen anderen untersuchten Geweben makroskopisch die höchste Dichte an NCAM-140*

Wie vermutet, ließ sich nachweisen, dass die graue Hirnsubstanz aus Autopsieproben das am stärksten NCAM-140-positive Gewebe dieser Studie ist. Gegenüber der weißen Substanz, allen untersuchten Gliomentitäten, sowie den anderen intrakraniellen Tumoren zeigte sich ein deutlicher Expressionsunterschied hinsichtlich NCAM-140. Die im Vergleich dazu untersuchte weiße Hirnsubstanz war dagegen relativ arm an NCAM-140. Zu erklären ist dieses Ergebnis durch den anatomischen Aufbau des gesunden Hirngewebes. In der grauen Substanz liegen hauptsächlich die Nervenzellkörper. Die weiße Substanz hingegen besteht überwiegend aus deren Axonen und Gliazellen. Wie schon Ronn et al. 1998 beschrieb, exprimieren Neurone mehr NCAM als Gliazellen. Hierin ist also der Unterschied in der Expression von NCAM-140 zwischen weißer und grauer Hirnsubstanz zu erklären.

Hinsichtlich der Expression von NCAM-120 und NCAM-180 können hier keine Aussagen getroffen werden, da lediglich die 140-kDa-Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls untersucht wurde.

### *6.3.2. Malignitätsgrad der Gliome und Expression von NCAM-140 verhalten sich reziprok*

In der makroskopischen Auswertung fiel auf, dass mit steigendem WHO-Grad die NCAM-140-Reaktivität sank. Waren die Astrozytome WHO-Grad I noch stark NCAM-140-positiv, zeigte sich bei den höhergradigen Astrozytomen der WHO-Grade II und III bereits ein deutlicher NCAM-140-Verlust. Glioblastome WHO-Grad IV waren in 71% der Fälle nur schwach NCAM-140 positiv; 17% zeigten keine Anreicherung des Immunmarkers. Der Rest war moderat bis stark NCAM-140-positiv. Die untersuchten Glioblastome WHO-Grad IV und die Astrozytome der WHO-Grade III und II wiesen signifikant weniger NCAM-140 auf als die analysierten Gewebeproben der weißen Hirnsubstanz. Die oligoastrozytären Mischgliome waren moderat NCAM-140-positiv. Das ist durchaus mit ihren WHO-Grad zu vereinbaren. Das liegt vor allem daran, dass bei oligoastrozytären Mischtumoren eine astrozytäre und eine oligodendrogliale Komponente vorhanden ist. Aufgrund des oligodendroglialen Tumoranteils, der wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte stärker NCAM-140-positiv ist als die astrozytäre Zellkomponente, kann eine moderate NCAM-140-Expression nachgewiesen werden. Auf Grund des oligodendroglialen Tumoranteils der Oligoastrozytome unterscheiden sich Oligoastrozytome WHO-Grad II und III daher auch nicht signifikant von den analysierten Oligodendrogliomen der WHO-Grade II und III.

Ependymome der WHO-Grad I und II wiesen eine schwache NCAM-140-Expression auf. Diese Gliomentitäten nehmen allerdings morphologisch und prognostisch eine Sonderstellung unter den Gliomen ein. Es liegen auch hier keine vergleichbaren Publikationen in der biomedizinischen Fachliteratur vor. Die Ermittlung der Bedeutung von NCAM-140 in diesen Gliomentitäten bedarf somit noch weiterer Untersuchungen.

### *6.3.3. Andere intrakranielle Tumore*

Alle untersuchten Meningeome WHO-Grad I, Hypophysenadenome, sowie Hirnmetastasen unterschiedlichem Primariums wiesen makroskopisch keine NCAM-140-Immunreaktivität in Form eines roten Niederschlages auf. Wie vermutet, exprimieren diese Gewebe kein NCAM-140.



#### *6.3.4. Ergebnisbewertung*

Das Ziel der makroskopischen Auswertung bestand in der Differenzierung der NCAM-140-Negativität mit bloßem Auge. Es war bereits mit bloßem Auge möglich, Unterschiede zwischen höhergradigen Gliomen und niedriggradigen Gliomen sowie tumorfreiem Hirngewebe aus Autopsieproben anhand der NCAM-140-Immunreaktivität festzustellen. Mit steigendem WHO-Grad kam es zu einer abnehmenden Rotfärbung der Präparate. Die NCAM-140-Expression, die in Form dieses roten Farbsubstrates nachgewiesen wurde, fiel daher kontinuierlich ab. Diese Methode der Abgrenzbarkeit könnte klinisch während einer Operation genutzt werden, um dem Operateur bereits ohne technische Hilfsmittel die Grenzen zwischen Tumor und umgebenden Gewebe zu zeigen. Natürlich wäre dieses Verfahren nur eine grobe Orientierung, da die meisten malignen Prozesse keine scharfe Abgrenzung zum gesunden Gewebe haben. Trotzdem könnte es in der klinischen Praxis Vorteile bringen. Bei höhergradigen Gliomen ist zumeist keine vollständige Resektion des Tumors mehr möglich. Vielmehr wird hier eine Reduktion der Tumormasse angestrebt um sekundäre Komplikationen zu vermeiden (Keles et al. 1999, Quigley et al. 1991). Selbst nach operativer Therapie sowie Radiatio und Chemotherapie mit Temozolamid sind die durchschnittlichen Überlebenszeiten eher gering. Bei Astrozytomen vom WHO-Grad I liegt die mediane Überlebenszeit bei 8-10 Jahren, bei Astrozytomen WHO-Grad II bei 7-8 Jahren. Patienten mit Astrozytomen vom WHO-Grad III haben nur noch eine durchschnittliche Überlebenszeit von 2-3 Jahren. Patienten mit einem Glioblastom vom WHO-Grad IV leben nach optimaler Therapie weniger als 1 Jahr (Greenberg MS et al. 2006, Stewart 2002, Barker et al. 1996).

Es gibt allerdings erfolgreiche Versuche, malignes Gewebe durch den Einsatz von fluoreszierenden Substanzen, wie zum Beispiel 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zu entfernen. Dieses Verfahren wurde an diffus infiltrierenden Astrozytomen getestet, die durch das infiltrierende Wachstum schwierig zu entfernen sind (Ishihara et al. 2007). ALA ist ein Vorläuferprotein bei der Synthese von Porphyrinen und führt bei Substitution zu einer Akkumulation von Protoporphyrin IX in neoplastischen Zellen. Unter ultraviolettem Licht resultiert das in einem rot fluoreszierenden Gewebe. Dabei verhält sich die Tumorfluoreszenz proportional zum Malignitätsgrad (Grieb P. 2004). So ist eine genauere und vollständigere Resektion des Tumors möglich. In der Neurochirurgie wird diese Methode bereits in vivo angewendet und führt zu einem statistisch signifikant höheren Überleben der Patienten mit malignen Gliomen ((Ishihara et al. 2007, Stepp et al. 2007, Stummer et al. 2006).

Die Möglichkeit einer makroskopischen Analyse des Expressionsgrades von NCAM-140 oder anderen NCAM-Isoformen auf Hirntumoren ist nach unserem Wissen noch nicht beschrieben.



Es muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass die makroskopisch mit bloßem Auge erkennbaren Unterschiede nur im Vergleich einiger Glioblastome untereinander und im Vergleich zum gesunden Autopsiegewebe erkennbar waren, nicht jedoch bei oligodendroglialen Tumoren, inklusive Oligoastrozytomen WHO-Grad II und III untereinander, sowie zwischen diesen Gliomentitäten und den Astrozytomen der WHO-Grade II und III.

Um genauere, quantifizierbare Aussagen bezüglich der signifikanten Unterschiede in der NCAM-140-Expression zwischen den einzelnen Tumorentitäten und der gesunden Hirnsubstanz treffen zu können, wurde in der vorliegenden Studie die NCAM-140-Immunreaktivität der humanen Tumore und der gesunden Hirnsubstanz aus Autopsieproben zusätzlich lichtmikroskopisch analysiert.

#### **6.4. Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung**

Die Intensität der NCAM-140-Immunreaktivität unter Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde mit einem Lichtmikroskop bei 20- und 40-facher Vergrößerung untersucht. Es wurden zehn Gesichtsfelder pro Tumorschnitt zufällig ausgewählt. In diesen Gesichtsfeldern wurde die Expressionsstärke der Tumorzellen für NCAM-140 subjektiv bestimmt. Hierbei wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Das genaue Analyseverfahren ist im Abschnitt „Material und Methoden“ genau beschrieben, wobei zwei voneinander unabhängige Untersucher die Analysen durchführten.

##### *6.4.1. Gesunde graue Hirnsubstanz exprimiert gegenüber allen untersuchten Geweben mikroskopisch die größte Menge an NCAM-140*

Lichtmikroskopisch war die graue Kontrollsubstanz aus Autopsieproben das am stärksten NCAM-140-positive Gewebe. Gegenüber der weißen Substanz, allen untersuchten Gliomen, sowie den zusätzlich untersuchten anderen intrakraniellen Tumoren zeigte sich ein deutlicher Expressionsunterschied hinsichtlich NCAM-140, der statistisch signifikant war. Die im Vergleich dazu untersuchte weiße Hirnsubstanz aus Autopsieproben war hingegen relativ arm an NCAM-140.

##### *6.4.2. Malignitätsgrad der Gliome und Expression von NCAM-140 verhalten sich reziprok*

In der lichtmikroskopischen Auswertung fiel auf, dass mit steigendem WHO-Grad die NCAM-140-Reaktivität sank. Glioblastome vom WHO-Grad IV waren mit einem lichtmikroskopisch erhaltenen Mittelwert von  $8,80 \pm 18,33$  deutlich NCAM-140-negativer als

Astrozytome vom WHO-Grad III mit einem Mittelwert von  $45,78 \pm 35,24$ , Astrozytome vom WHO-Grad II mit einem Mittelwert von  $132,57 \pm 65,30$  und Astrozytome vom WHO-Grad I mit einem Mittelwert von  $105,27 \pm 52,96$ . Bei den oligoastrozytären Mischgliomen zeigten sich ähnliche Verhältnisse. Oligoastrozytome WHO-Grad III mit einem NCAM-140-Mittelwert von  $100,28 \pm 6,29$  waren NCAM-140-negativer als Oligoastrozytome WHO-Grad II mit einem Mittelwert von  $156,64 \pm 75,83$  sowie Oligodendrogliome WHO-Grad II mit  $146,74 \pm 83,30$ . Das gleiche Ergebnis konnte auch makroskopisch festgestellt werden.

In der biomedizinischen Fachliteratur ist eine Reihe von Daten beschrieben, die sich ebenfalls mit der NCAM-Expression in Gliomen beschäftigen. Die Ergebnisse der einzelnen Publikationen sind allerdings unterschiedlich und zum Teil auch widersprüchlich (Huang et al. 2001, Tews und Nissen 1998, Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999, Sasaki et al. 1998). Kleinschmidt-DeMasters et al. und Tews und Nissen konnten bei ihren Untersuchungen, im Gegensatz zu unseren Forschungsergebnissen, keinen Zusammenhang zwischen der NCAM-Expression und dem WHO-Grad der untersuchten astrozytären Gliome aufzeigen. Die NCAM-140-Immunreaktivität schwankte in diesen Arbeiten bei den Glioblastomen WHO-Grad IV, die negative bis starke NCAM-140-Positivitäten zeigten. Ursächlich hierfür können Antikörpervarianten sein. Tews und Nissen verwendeten in diesen Studien einen monoklonalen Antikörper, der ein Epitop besitzt, das alle drei NCAM-Hauptisoformen (NCAM-120, -140, -180) erkennt. So wurde nicht speziell NCAM-140 untersucht, sondern auch die anderen zwei großen Isoformen.

Es ist denkbar, dass unterschiedliche Subtypen der Glioblastome (z.B. Riesenzellglioblastome, kleinzellige, fusiforme und globuliforme Glioblastome) verschiedene Molekülaustattungen aufweisen, die letztendlich bei der Entdifferenzierung eine unterschiedliche Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen auslösen. Die Auswirkungen auf die Überlebenszeit und den prognostischen Wert der NCAM-140-Immunreaktivität, der sich daraus ergeben könnte, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Die Unterteilung in histologische Glioblastom-Subtypen muss bei diesen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Es gibt Untersuchungen, die die in dieser vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bekräftigen (Huang et al. 2001, Sasaki et al. 1998). Die Forschungsgruppe um Sasaki untersuchte 23 astrozytäre Tumore mittels Western Blot und sieben dieser Tumore immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes NCAM. Hier

konnte ebenfalls ein reziproker Zusammenhang zwischen WHO-Grad und NCAM-140 Expression nachgewiesen werden (Sasaki et al. 1998).

Huang untersuchte 48 Astrozytome der WHO-Grade I-III mit einem monoklonalem Antikörper gegen NCAM. Mit zunehmenden WHO-Grad fiel auch hier die NCAM-Expression dieser Tumore. Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine reduzierte NCAM-Expression für die Entwicklung der Malignität eine Rolle spielen könnte (Huang et al. 2001).

#### *6.4.3. Andere intrakranielle Tumore*

Hirnmetastasen wiesen mit der lichtmikroskopisch ermittelten NCAM-Reaktivität von  $2,62 \pm 2,00$  fast keine NCAM-140-Expression auf. Meningeome waren die am deutlichsten negativen Gewebeproben mit einem lichtmikroskopisch erhaltenen Mittelwert von  $0,43 \pm 0,79$ . Lediglich bei Hypophysenadenomen konnte mit einem Mittelwert von  $28,74 \pm 19,49$  hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität eine geringe NCAM-140-Expression im Vergleich zu Meningeomen und Metastasen nachgewiesen werden. Alle nicht gliomatösen Gewebe waren signifikant deutlich NCAM-140-negativer als die gesunde graue Substanz aus Autopsieproben und Astrozytome vom WHO-Grad I und II.

Im Vergleich zur makroskopischen Analyse verhalten sich die lichtmikroskopischen Ergebnisse ebenfalls direkt proportional. Lichtmikroskopisch sowie makroskopisch konnte bei nichtepithelialen Tumoren eine geringe bis keine NCAM-140-Reaktivität nachgewiesen werden. In der biomedizinischen Fachliteratur gibt es soweit keine vergleichbaren Untersuchungen, so dass ein Vergleich mit anderen Ergebnissen nicht diskutiert werden kann.

### **6.5. Ergebnisse der densitometrischen Auswertung**

#### *6.5.1. Graue Hirnsubstanz aus Autopsiegewebe exprimiert gegenüber allen untersuchten Geweben densitometrisch die größte Menge an NCAM-140*

Auch in der densitometrischen Analyse bestätigten sich die bereits in der Mikroskopie und in der Makroskopie gewonnenen Ergebnisse. Die graue Substanz aus Autopsieproben ist mit einem Mittelwert von  $157,92 \pm 4,09$  hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität das am deutlichsten NCAM-140-positive Gewebe. Da mit der Densitometrie ein objektives Verfahren zur Ergebnisbeurteilung verwendet wurde, kann man die Ergebnisse der subjektiven Methoden (Makroskopie und Mikroskopie) auf ihre Aussagekraft hin prüfen. Alle drei Auswertungsmethoden ergaben hinsichtlich des Expressionsstatus von NCAM-140 in grauer

Substanz aus Autopsiegewebe ähnliche Ergebnisse. Die NCAM-140-Immunreaktivität ist bei tumorfreier grauer Substanz aus Autopsieproben am höchsten.

#### *6.5.2. Malignitätsgrad der Gliome und Expression von NCAM-140 verhalten sich indirekt proportional*

Die densitometrisch ermittelte NCAM-140-Immunreaktivität von Glioblastomen vom WHO-Grad IV war mit einem Mittelwert von  $140,91 \pm 4,16$  deutlich negativer. Mit steigendem WHO-Grad konnte auch eine schwächere Expression nachgewiesen werden, so dass Astrozytome WHO-Grad III mit einem Mittelwert von  $142,84 \pm 2,29$ , Astrozytome WHO-Grad II mit einem Mittelwert von  $143,19 \pm 4,67$  und Astrozytome WHO-Grad I mit einem Mittelwert von  $150,64 \pm 2,63$  hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität bereits deutlich NCAM-140-positiver waren. Oligoastrozytome WHO-Grad II waren NCAM-140-positiver als Oligoastrozytome WHO-Grad III. Insgesamt fiel mit steigendem WHO-Grad die NCAM-140-Expression stetig ab. Dieses Ergebnis konnte schon in der makroskopischen und in der mikroskopischen Analyse beobachtet werden. In allen drei Analyseverfahren konnte bestätigt werden, dass die Expression von NCAM-140 indirekt vom WHO-Grad des Tumors abhängt. So liegt die Vermutung nahe, dass NCAM-140 in der Biologie des malignen Tumorwachstums eine entscheidende Rolle spielt (Huang et al. 2001, Bussolati et al. 2006, Cavallaro und Christofori 2004).

#### *6.5.3. Andere intrakranielle Tumore*

Intrakranielle Tumore exprimierten densitometrisch wenig oder kein NCAM-140. Hirnmetastasen waren mit einem densitometrischen Mittelwert von  $133,59 \pm 3,35$  genauso negativ wie Meningeome vom WHO-Grad I mit einem Mittelwert von  $133,25 \pm 0,96$ . Hypophysenadenome sind hinsichtlich der NCAM-140-Immunreaktivität mit einem Mittelwert von  $135,62 \pm 5,70$  leicht positiver als die anderen intrakraniellen nichtgliomatösen Hirntumore, aber ebenfalls deutlich NCAM-140-negativ. Insgesamt ergaben sich aber vergleichbare Ergebnisse wie bei den anderen beiden Analyseverfahren.

Hypophysenadenome sind größtenteils gutartige Tumore. Trotzdem sind einzelne Fälle aggressiv wachsender und metastasierender Adenome bekannt (Trouillas et al. 2003). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass NCAM durchaus als prognostischer Marker in diesen Tumoren eingesetzt werden kann (Trouillas et al. 2003, De Jong et al. 1999). Trouillas untersuchte Hypophysenadenome immunhistochemisch auf NCAM. Er stellte ebenfalls eine

reziproke Korrelation zwischen der NCAM-Expression und dem Invasionspotential dieser Tumore fest.

Figarella-Branger bewies, dass auf Meningeomen jedes Zelladhäsionsmolekül eine charakteristische Expression hat, abhängig vom jeweiligen Subtyp und WHO-Grad (Figarella-Branger et al. 1997).

## **6.6. Mögliche Bedeutung von NCAM-140 bei der malignen Tumorprogression**

Eine Ursache in der NCAM-140-Negativität der Glioblastome gegenüber den anderen untersuchten Gliomentitäten liegt wahrscheinlich am histologischen Aufbau und Verhalten. Glioblastome besitzen das höchste Proliferationspotential und exprimieren die meisten aggressiv proteolytischen Enzyme (Tews und Nissen 1998, Maidment et al. 1997). Das führt zu einem so schnellen Verlust der strukturellen Integrität des umliegenden Gewebes, das alle physiologischen Matrixbestandteile verloren gehen. So ist es nicht verwunderlich, dass im Tumorzentrum keine NCAM-Immunreaktivität mehr nachweisbar ist. Wie weiter unten noch genauer beschrieben wird, ist die NCAM-Reaktivität von den proteolytischen Prozessen indirekt abhängig (Edvardsen et al. 1993). Astrozytome der WHO-Grade II und III, sowie Oligodendrogliome und Mischgliome zeichnen sich hingegen eher durch eine weniger starke Proliferation aus, was letztendlich auch an den Überlebensraten deutlich wird (Herron et al. 1986, Nakano et al. 1995). Diese Ergebnisse bestätigen die schon von Huang erhaltenen Daten, dass mit steigendem Proliferationspotential die NCAM-Expression absinkt (Huang et al. 2001).

Im Vergleich zu den oben genannten Studien (Huang et al. 2001, Tews und Nissen 1998, Kleinschmidt-DeMasters et al. 1999, Sasaki et al. 1998) wurden in der vorliegenden Arbeit neben astrozytären Gliomen auch zusätzlich Oligoastrozytome der WHO-Grade II und III, sowie Oligodendrogliome WHO-Grad II immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Mischgliome weniger NCAM-140 exprimieren als die gesunde graue Substanz tumorfreier Autopsieproben und als Glioblastome vom WHO-Grad IV. Des Weiteren waren Oligodendrogliome und Oligoastrozytome vom WHO-Grad II deutlich NCAM-140-positiver als die astrozytären Vertreter identischen WHO-Grades. Oligoastrozytome WHO-Grad III zeigten im Vergleich zu Astrozytomen WHO-Grad III eine geringere NCAM-140-Expression. Insofern unterscheiden sich diese Tumorentitäten nicht nur morphologisch, sondern auch hinsichtlich ihres NCAM-140-Expressionsverhaltens

untereinander, sowie im Vergleich zu anderen Tumorentitäten. Ursächlich hierfür ist der unterschiedliche histopathologische Aufbau der Mischgliome. Oligodendrogliome WHO-Grad II sind gut differenzierte Tumore, Oligodendrogliome WHO-Grad III zeichnen sich durch erhöhte Zellproliferation, Kernatypien, erhöhte mitotische Aktivität sowie vaskuläre Proliferation aus und erfüllen somit alle Kriterien der anaplastischen Variante. Weiterhin bestehen ebenfalls Unterschiede in der Überlebenszeit (Wharton et al. 1998, Wharton et al. 2001). Eine Signifikanztestung der hier erhaltenen Ergebnisse, war aufgrund der geringen Fallzahl dieser Tumore nicht möglich.

Invasives Wachstum ist nicht das einzige aber eines der typischsten Charakteristika von Gliomen. Damit eine Tumorzelle invasiv wird, muss sie einige Modifikationen unterlaufen, die unter anderem im Zusammenhang mit Interaktionen der extrazellulären Matrix stehen (Tonn und Goldbrunner 2003). Liotta präsentierte die Gliom-Invasion als einen Drei-Schritt-Prozess. Demnach kommt es zu erst zu einer starken Befestigung der invadierenden Zelle an Komponenten der extrazellulären Matrix, gefolgt von einer proteolytischen Degradierung der Matrixkomponenten und schließlich zur Invasion der infiltrierenden Zelle in die somit entstandene extrazelluläre Lücke (Liotta et al. 1982).

In Anlehnung an Kohn und Liotta ist die Tumorzellinfiltration als ein aktiver Prozess beschrieben, bei dem einzelne Tumorzellen entlang von zellulären Strukturen invasiv ins umliegende Gewebe penetrieren. Dabei werden oft Barrieren der extrazellulären Matrix überwunden und zerstört (Kohn und Liotta 1995). Während man bei anderen Karzinomen oft eine lymphogene oder vaskuläre Metastasierung in andere Organe beobachten kann, ist die Metastasierung maligner Gliome relativ selten nachweisbar (Bernstein und Woodard 1995, Pilkington 1997).

In diesem Zusammenhang wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass NCAM-140 während der Migrationsphase und Proliferationsphase von Gliomzellen herunter reguliert ist, während Matrixmetalloproteinasen ansteigen (Maidment et al. 1997, Gratsa et al. 1997). Diese Prozesse dienen möglicherweise dazu, die Ablösung der Tumorzellen zu erleichtern und damit die Zellinvasion zu fördern (Gratsa et al. 1997, Edvardsen et al. 1993). Diese Experimente bestätigen die Vermutung, dass NCAM-140 nicht nur eine entscheidende Rolle im Adhäsivitätsprozess der Zellen, sondern auch in ihrer Wachstumsregulation spielt (Cavallaro und Christofori 2004, Tonn und Goldbrunner 2003).

Da es sich bei dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül um einen Negativmarker humaner Gliome handelt, stellt sich folgende Frage. Wie sind Proliferationsgrad und NCAM-Expression voneinander abhängig? Sinkt im ersten Schritt die NCAM-140-Expression und erhöht somit indirekt die Proliferation, oder wird zuerst die Proliferation erhöht und es kommt dadurch zum Abfall der NCAM-140-Expression? Eine wichtige Rolle kommt hier den Matrix-Metalloproteinasen zu, die diesbezüglich durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits untersucht wurden (Tews und Nissen 1998, Maidment et al. 1997, Edvardsen et al. 1993, Herron et al. 1986, Nakano et al. 1995, Gratsa et al. 1997). Tews und Nissen 1998 bewiesen in ihrer Arbeit, dass eine steigende Proliferation mit einer Erhöhung von proteolytischen Enzymen wie den Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 verknüpft ist. Dabei fällt die Expression von NCAM während der malignen Transformation. Edvardsen et al. 1993 zeigte in einer weiteren Studie, dass ein Rückgang der NCAM-140-Expression mit einer Erhöhung von Matrix-Metalloproteinasen assoziiert ist. Letztendlich sind diese für das Auflösen von Matrixkomponenten verantwortlich und erlauben so den Gliomzellen weit in das umliegende Gewebe vorzudringen (Gratsa et al. 1997, Maidment et al. 1997). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass maligne Gliome durch den Verlust der NCAM-140-Expression die Fähigkeit besitzen, in das umgebende Hirngewebe zu invadieren (Bussolati et al. 2006, Cavallaro und Christofori 2004, Tonn und Goldbrunner 2003).

Verschiedene Studien zeigten eine funktionelle Einflechtung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls in die Tumorprogression unterschiedlicher Primärtumore (Cavallaro und Christofori 2004, Tonn und Goldbrunner 2003, Huang et al. 2001).

Es gibt allerdings unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Art und Weise, wie NCAM Einfluss auf die Tumorprogression nimmt. Ein Ansatzpunkt ist die zelluläre Signaltransduktion. Es ist bereits gezeigt worden, dass der Verlust der NCAM-140-Expression zu Veränderungen der intrazellulären Signale führt (Krushel et al. 1995, Sporns et al. 1995). Sporns und Krushel isolierten intrazelluläre Signale, die durch NCAM-homophile Bindung ausgelöst werden. Sie führen zu einem Sistieren der Glia- sowie der Rattengliomzellproliferation. Crnic et al. 2004 beobachtete mit einer Verminderung von NCAM in  $\beta$ -Zell Tumoren des Pankreas ansteigende lymphangiogenetischen Faktoren wie VEGF-C (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor). Durch die dadurch erhöhte Zellmotilität wird ein Ablösen der Tumorzellen aus dem Zellverband und eine beginnende



lymphatische Metastasierung begünstigt. Wahrscheinlich werden hier intrazelluläre Signale ausgelöst, die zu einer Änderung der Genexpression führen (Perl et al. 1999).

Prag et al. 2002 zeigte, dass eine Transfektion von Rattengliomzellen mit dem Gen für NCAM-140 zu einer Reduktion der freien Zellbeweglichkeit im Vergleich zu NCAM-140-negativen Kontrollzellen führt. Das führt zu einer Reduktion der Zellbefestigung und damit zum Abfall der Zellbeweglichkeit.

Zusammenfassend scheint das Neurale Zelladhäsionsmolekül nicht nur eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und der Zell-Matrix-Adhäsion zu spielen. Es ist darüber hinaus wahrscheinlich auch bei der Malignitätsentwicklung beteiligt (Bussolati et al. 2006, Cavallaro und Christofori 2004, Tonn und Goldbrunner 2003).

Zum einen resultiert der Verlust der NCAM-Expression einer Zelle in der Reduktion der Adhäsion zwischen den Tumorzellen. Dadurch können sich einige Tumorzellen lösen und in andere Hirnregionen absiedeln (Kohn und Liotta 1995, Cavallaro und Christofori 2004, Liotta et al. 1982)

Zum anderen wird durch eine Erhöhung der NCAM-Expression in ausgewählten Zellen aktiv Einfluss auf die Neoangiogenese des Tumors genommen, da hier wiederum Zelladhäsionen nötig sind (Gratsa et al. 1997, Edvardsen et al. 1993, Cavallaro und Christofori 2004, Crnic et al. 2004, Perl et al. 1999, Bussolati et al. 2006, Hakansson et al. 2005).

Zusammenfassend kann die Vermutung bestätigt werden, dass NCAM-140 eine entscheidende Rolle bei der Progression, Migration und Entdifferenzierung von humanen Gliomen spielt. Zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der Signaltransduktion sowie der malignen Transformation sind notwendig, um den molekularen Mechanismus der Gliomentwicklung besser zu verstehen und die intrazellulären Signalwege zu entschlüsseln, um letztendlich daraus neue Therapieansätze zu entwickeln, welche die Letalität entscheidend senken können.

Weiterhin wurden in dieser Studie Meningeome, Hypophysenadenome und Hirnmetastasen als nichtgliomatöse Hirntumore, sowie Ependymome WHO-Grad I und II als Gliome untersucht. Alle nichtgliomatösen Gewebe waren makroskopisch sowie lichtmikroskopisch deutlich NCAM-140 negativ. Lediglich Hypophysenadenome wiesen bei der densitometrischen Untersuchung eine sehr geringe NCAM-140-Expression auf. Ependymome WHO-Grad I und II zeigten eine schwache NCAM-140 Expression. Da NCAM weder in

Zellen des Plexus choroideus noch in gutartigen Papillomazellen exprimiert wird, jedoch in ependymalen Zellen und in deren Tumoren, kann daraus geschlossen werden, das NCAM einen potentiellen diagnostischen Marker darstellt um zwischen Ependymomen und Tumoren des choroidalen Plexus zu unterscheiden (Figarella-Branger et al. 1995). Jedoch weiß man bis heute sehr wenig über die Ontogenese von diesen Tumoren. Oft sind sie im lateralen Ventrikel rund um das Foramen Monroi lokalisiert und zeichnen sich durch eine lange Überlebenszeit aus (Lopes et al. 1996, Lombardi et al. 1991). Da in der vorliegenden Arbeit zu wenige Tumore dieser Entität untersucht werden konnten, bedarf es weiterer Studien zur Histogenese und zur neuronalen Differenzierung um Ependymome genauer einzuordnen.

### **6.7. Visualisierung der Invasionszone in humanen Gliomen**

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir zu einem weiteren Ergebnis kommen, das unseres Wissens noch in keiner biomedizinischen Publikation beschrieben wurde. In einzelnen Fällen ist es gelungen, die peritumorale Hirnsubstanz - also NCAM-140-positives Gewebe von NCAM-140-negativen Glioblastomgewebe abzugrenzen. Es konnten lichtmikroskopisch NCAM-140-negative Glioblastomzellnester, eine diffuse Einzelzell-Invasion sowie auch makroskopisch eine relativ scharfe Tumorgrenze beobachtet werden. Grundlage dafür ist die starke NCAM-140-Positivität des peritumoralen Hirngewebes und die NCAM-140-Negativität der Glioblastomzellen. Graue Substanz aus Autopsieproben ist NCAM-140-positiv, was bereits makroskopisch sichtbar ist. Zur weißen Substanz aus Autopsiegewebe konnte immunhistochemisch keine scharfe Abgrenzung nachgewiesen werden, da diese weniger NCAM exprimiert. Schwieriger ist der Vergleich von grauer Substanz aus Autopsiegewebe zu anderen Gliomentitäten. Hier konnten ebenfalls Tumordinvasionszonen beobachtet werden, die weniger NCAM-140 exprimierten als die graue Substanz. Eine genaue Abgrenzung zeigte sich hier allerdings nicht. Gliome unter dem WHO-Grad IV sind nicht vollständig NCAM-140 negativ, so dass immer eine Restimmunreaktivität nachweisbar war. Eine Trennung vom gesunden Gewebe war daher nicht möglich. Die gezeigte Abgrenzung zwischen NCAM-140-negativen Tumorbereichen und peritumoralen Gewebe kann neue Optionen für die Gliomerfassung ermöglichen.

## **6.8. NCAM-Expression in nichtgliomatösen intrakraniellen Tumoren**

Neben den untersuchten Gliomen wurde die NCAM-140-Expressionsdichte auch in verschiedenen Karzinom-Metastasen, Meningeomen WHO-Grad I und Hypophysenadenomen ermittelt.

Über die NCAM-140 Expression in Meningeomen ist zurzeit wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden sieben Meningeome WHO-Grad I hinsichtlich des NCAM-140 Expressionsverhaltens untersucht. Alle untersuchten Präparate waren durchweg NCAM-140-negativ. In einer voran gegangenen Studie beobachtete man, dass Meningeome teilweise NCAM-positiv sind (Garin-Chesa et al. 1991). Jedoch wurden in dieser Studie keine Information zu den Subtypen und WHO-Graden der untersuchten Meningeome angegeben. Daher ist es nicht möglich diese Daten mit unseren gewonnenen Ergebnissen zu vergleichen. Es existieren jedoch Daten über andere Zelladhäsionsmoleküle. Figarella-Branger et al. 1997 untersuchte meningotheliale, transitionale und fibroblastische Meningeome in Bezug auf die Expression von CD44, welches ebenfalls als Zelladhäsionsmoleküle fungiert. CD44 konnte in allen Meningeomen nachgewiesen werden, wobei die Expression in transitionalen und meningothelialen Meningeomen höher war als in fibroblastischen Meningeomen. In weiteren Studien wurde die Expression von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 4-Integrinen in humanen Meningeomen untersucht (Beschet et al. 1999, Paulus et al. 1993). Es existierten zwar Unterschiede in der Expressionsstärke, aber auch hier wurde eine Expression in Meningeomen nachgewiesen. Es wurde sogar gezeigt, dass in anaplastischen Meningeomen die Expression von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen im Vergleich zu fibroblastischen Meningeomen signifikant geringer war (Beschet et al. 1999). Ferner wurde gezeigt, dass jedes Zelladhäsionsmolekül eine charakteristische Expression auf Meningeomen zeigt, abhängig vom jeweiligen Subtyp und WHO-Grad (Figarella-Branger et al. 1997). Es scheint insofern auch schlüssig, dass Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der verschiedenen Meningeomtypen spielen (Figarella-Branger et al. 1997, Beschet et al. 1999, Paulus et al. 1993).

Die in dieser vorliegenden Studie untersuchten Metastasen waren NCAM-140-negativ. In der Literatur existieren bisher nur einzelne Untersuchungen zur NCAM-140-Expression der zugehörigen Primärtumore (Xian et al. 2006, Thiery 2002, Taniguchi et al. 2001, Fogar et al. 1997).

Es ist bereits bekannt, dass eine Invasion der Tumorzellen - als Konsequenz einer erhöhten Proliferation - Veränderungen in der Zell-Zell-Adhäsion, der Zellmotilität und der epithelial-mesenchymalen Interaktion voraussetzt (Thiery 2002, Xian et al. 2006). Jedoch ist die zugrunde liegende Ursache einer hämatogenen Absiedlung der Tumorzellen bisher in ihrem exakten Mechanismus letztlich noch unbekannt (Xian et al. 2006, Gavert et al. 2007, Taniguchi et al. 2001). Interessanterweise unterliegt die NCAM-Expression signifikanten Veränderungen in humanen Tumoren. In Kolonkarzinomen, Pankreaskarzinomen und Gliomen ist die NCAM-Expression herunter reguliert, was wiederum mit einer schlechten Prognose korreliert (Gavert et al. 2007, Fogar et al. 1997, Häkansson et al. 2005). Das metastatische Potential eines Tumors korreliert aber auch mit der Stabilität der umgebenden Blutgefäße (Taniguchi et al. 2001, Sadanandam et al. 2007, Xian et al. 2006). Xian et al. 2006 beobachtete, dass NCAM eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung dieser Blutgefäße spielt, indem es den Zell-Zell-Kontakt zwischen Endothelzellen und Pericyten durch Änderung der Genexpression aufrechterhält. So kann NCAM scheinbar die Metastasenbildung verschiedener Tumoren limitieren, indem es die umliegenden Blutgefäße stabilisiert und ihre Funktion aufrecht erhält (Xian et al. 2006, Häkansson et al. 2005, Taniguchi et al. 2001).

Fogar et al. 1997 untersuchte 31 kolorektale Karzinome. Er beobachtete, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration von NCAM-140 und der biologischen Aggressivität des Tumors besteht. Kolonkarzinome, die wenig differenziert waren, zeigten niedrigere Serum NCAM-Konzentrationen als die gleichen Entitäten mit einer G2- oder G1-Differenzierung. Als Vergleich konnte NCAM im Serum bei Adenomen des kolorektalen Bereichs gefunden werden (Cole und Glaser 1986, Fogar et al. 1997). Bei Karzinomen des Pankreas oder der Brust zeigte sich eine verminderte Expression des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls im Vergleich zu gesundem gleichartigem Gewebe (Fearon und Pierceall 1995, Roesler et al. 1997, Fogar et al. 1997). Die in der vorliegenden Studie immunhistochemisch untersuchten Kolonkarzinom-Metastasen waren ebenfalls NCAM-140-negativ.

Die in verschiedenen Studien untersuchten Mammakarzinome exprimierten nur niedrige Mengen an NCAM (Garin-Chesa et al. 1991, Shih et al. 1997). Mel-CAM, ein Adhäsionsmolekül, was auch zur Familie der Immunglobuline gehört, konnte in gesundem duktalem Epithelgewebe der Brust nachgewiesen werden. In Mammakarzinomen kam es hingegen zu einem Expressionsverlust (Shih et al. 1997). Weiterhin konnte bei einer

Transfektion von Zellen mit Mel-CAM-cDNA ein deutlich verringertes Tumorwachstum nachgewiesen werden (Shih et al. 1997). Auch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigten eine NCAM-140-Negativität der Mammakarzinom-Metastasen. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der untersuchten Fallzahl nicht als zuverlässig zu bewerten.

Die analysierte Urothelkarzinom-Metastase war ebenfalls NCAM-140-negativ. Hier liegen jedoch nach unserem Wissen noch keine Untersuchungen zur Expression von NCAM-140 in Urothelkarzinomen vor.

Die untersuchte Bronchial-Karzinom-Metastase war ebenfalls NCAM-140-negativ. In einer vorangegangenen Studie wurde allerdings berichtet, dass kleinzellige Bronchialkarzinome NCAM-140-positiv sind (Lantuejoul et al. 1998). Eine mögliche Ursache dieser Expressionsunterschiede zwischen Metastase und Primärtumor liegt darin, dass die Tumorzellen, die für Metastasenabsiedlung verantwortlich sind, sich von den eigentlichen Tumorzellen, die den Primärtumor geformt haben unterscheiden (Albelda 1993).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Analyse der Serumkonzentrationen von NCAM-Isoformen bei Patienten mit Gliomen oder Metastasen verschiedenen Primariums und der Vergleich mit Kontrollgruppen. Die hoch invasive Natur von malignen Hirntumoren ist oft Ursache von Morbidität und Mortalität und limitiert meist die komplette Resektion des Malignoms (Demuth und Berens 2004, Wharton et al. 1998, Wharton et al. 2001). Bei Patienten mit Metastasen des ZNS konnte hochmolekulares NCAM (>130 kDa) und niedermolekulares NCAM (<130 kDa) im Serum nachgewiesen werden (Todaro et al. 2007). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass bei erfolgreicher Therapie beide molekularen NCAM-Formen in 75% der Fälle sanken (Todaro et al. 2007). Die Regression des Tumors ist in dieser Studie mit einer Normalisierung der NCAM-Expression assoziiert. Dieses wiederum stellt eine Möglichkeit dar, das neurale Zelladhäsionsmolekül als einen Serummarker in weiteren Studien zu untersuchen.

Das Plasmozytom und dessen Metastasen sind durch eine steigende Zahl maligner Plasmazellen gekennzeichnet. Diese Plasmazellen besitzen spezielle Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel NCAM (CD56) (Sahara und Takeshita 2004). Chang et al. untersuchte CD56 positive Myelomzellen in acht Patientenseren mit Multiplen Myelom und ZNS Beteiligung. In drei Fällen war NCAM im Knochenmark und in einem Fall im Liquor

nachweisbar. In einer Kontrollgruppe von 84 Patienten mit Plasmozytom ohne Beteiligung des Zentralnervensystems zeigten sich in 68 Fällen NCAM-positive Myelomzellen im Knochenmark. Eine geringe Expression von NVAM auf Myelomzellen zeigt eine häufigere Beteiligung des Zentralnervensystems (Chang et al. 2005). Weiterhin kommt es beim NCAM-Mangel auf Myelomzellen zu einer signifikanten Änderung der Gentranslokation dieser Zellen (Hundemer et al. 2007). Ein Zusammenhang zwischen NCAM-positiven Myelomzellen und der Prognose des Patientenkollektives ließ sich nicht beweisen (Kraj et al. 2008, Smith et al. 1996, Hundemer et al. 2007). Allerdings spielt das Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle in der Pathogenese des multiplen Myeloms (Chang et al. 2005). Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Expression von NCAM-140 in Plasmozytommetastasen. Hierbei lag in allen Fällen eine Beteiligung des Zentralnervensystems vor. Alle untersuchten Metastasen waren NCAM-140-negativ. In weiterführenden Studien sollte die Expression von NCAM in Plasmozytommetastasen und die NCAM-140-Expression im Knochenmark von Patienten mit Plasmozytom ohne Beteiligung des Zentralnervensystems untersucht werden.

Hypophysenadenome waren hingegen in allen untersuchten Fällen schwach NCAM-140-positiv. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Forschungsergebnissen überein. Daniel et al. 2000 untersuchte die Expression von PSA-NCAM in gesundem Hypophysengewebe und in Hypophysenadenomen von Ratten. Er beobachtete nachweisbare NCAM-140-Expressionen in tumorös veränderten Hypophysen. Dabei war die Immunreaktion stets schwächer als in gesundem Hypophysengewebe. Ikeda et al. bewies, das es auch Zelladhäsionsmoleküle gibt, die mit steigender Malignität stärker exprimiert werden. Er untersuchte Hypophysenadenome, die mehrere Hormone produzieren. Dabei stieg mit der Invasivität dieser Tumore die Expression von Tenascin an (Ikeda et al. 1995). Andere Publikationen zeigen, das NCAM-140 und NCAM-180 auch in anderen neuroendokrinen Geweben nachweisbar sind (Figarella-Branger et al. 1996, Lackie et al. 1990). Ursprünglich sind Hypophysenadenome gutartige Tumore. Jedoch besitzen einige von ihnen auch aggressives Potential, invadieren das umliegende Gewebe und bilden sogar Metastasen (Trouillas et al. 2003, Saeger und Lubke 1996). Nach histopathologischen Kriterien handelt es sich dann um Karzinome (Saeger und Lubke 1996, Schäfer und Riede 2001). Jedoch sind die Faktoren, die zu diesen Veränderungen führen noch unbekannt (Ray und Melmed 1997, Asa und Ezzat 1998). NCAM sowie PSA-NCAM haben großen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen der Hypophyse. Strukturelle Modifikationen im adenohipophysialen Bereich gehen stets mit Veränderungen

der NCAM-Expression einher (Trouillas et al. 2003, Daniel et al. 2000). Das beweist, dass diese Moleküle eine bedeutende Rolle bei der Histogenese der Adenohypophyse spielen (Berardi et al. 1995, Trouillas et al. 2003, Daniel et al. 2000).

Weiterführende Experimente sind in Zukunft notwendig, um die Bedeutung von NCAM-140 und anderen NCAM-Isoformen bei der Progression dieser intrakraniellen Tumore aufzudecken und festzustellen, ob es auch hier einen Zusammenhang zwischen der NCAM-Expression und der Aggressivität der Tumore gibt. Dabei gilt es zu ermitteln, welche Zelladhäsionsmoleküle in gesundem Hypophysengewebe im Vergleich zu tumorös verändertem Gewebe nachweisbar sind, welche Signalkaskaden bei dem Prozess der Adenomentstehung ablaufen und inwiefern diese Auswirkungen auf die Genexpression der einzelnen Adhäsionsmoleküle haben.

## **6.9. NCAM-Expression bei der Funktion anderer neuraler Prozesse**

Das neurale Zelladhäsionsmolekül ist darüber hinaus in ein weitaus breiteres Spektrum neuronaler Funktionen involviert. Die in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhänge zwischen der Expression von NCAM in Gliomen, stellen nur einen Bruchteil der Prozesse dar, auf die NCAM zusätzlich noch Einfluss haben kann. Viele Publikationen (Sullivan et al. 2006, van der Borght und Brundin 2006, Huerta et al. 2001, Ramsay et al. 2008, Winter et al. 2008, Markovic-Lipkovski et al. 2007) zeigen, dass die drei Hauptisoformen von NCAM sowie PSA-NCAM innerhalb sowie auch außerhalb des ZNS eine zentrale Rolle spielen. Wie schon beschrieben, kommt NCAM in Neuronen sowie deren Vorläuferzellen vor (Krushel et al. 1998, Sporns et al. 1995, Amoureux et al. 2000). Es ist also nicht verwunderlich, dass bei verschiedenen zentralen Störungen (z.B. Chorea Huntington oder Schizophrenie) ebenfalls NCAM-140 und NCAM-180-Veränderungen nachgewiesen werden können. Sullivan et al. 2006 konnte ein Gen isolieren, welches bei Patienten mit Schizophrenie im Hippocampus und im präfrontalen Kortex unterschiedlich stark exprimiert wird. Dieses Gen kann direkt Einfluss auf die NCAM-Expression nehmen, indem es über Tyrosinkinaserzeptoren dessen Expression steuert. In anderen Studien wurde die Chorea Huntington untersucht (van der Borght und Brundin 2006, Nihei und Kowall 1992). Diese stellt eine erbliche neurologische Erkrankung dar. Dabei kommt es zum Untergang GABA-haltiger Neurone im Globus pallidus und Putamen. Das Resultat ist eine Fehlinhibition des Thalamus. Die Betroffenen leiden unter hyperkinetischen Bewegungsabläufen sowie unter einem Verlust kognitiver Fähigkeiten



(Hamilton et al. 1999, Nihei und Kowall 1992, van der Borght und Brundin 2006). Hier konnte im Mausmodell eine PSA-NCAM-Reduktion im Hippocampus und piriformen Kortex nachgewiesen werden (van der Borght und Brundin 2006). Durch den geringer ausgeprägten Zell-Zell-Kontakt und die nachlassende interzelluläre Stabilität kommt es hier zu Störungen in der Impulsweiterleitung sowie zum Verlust von Neuronen, was mitunter für bestimmte Symptome dieser Erkrankung verantwortlich gemacht wird (van der Borght und Brundin 2006, Nihei und Kowall 1992, Hamilton et al. 1999).

Im Nukleus suprachiasmaticus konnte bei Hamstern eine PSA-Fluktuation während eines 24 Stunden-Tag/Nacht-Zyklus beobachtet werden (Glass et al. 2003). In diesen Experimenten kam es zum Abfall von PSA von mehr als 90 % während der Nachtzyklen und zu einer maximalen Expression eine Stunde nach Lichtexposition (Glass et al. 2003). Diese dynamischen Veränderungen auf den Zelloberflächen legen nahe, dass eine Beziehung zum zirkadianen Rhythmus besteht und dass diese schnellen Wechsel durch Licht ausgelöst werden können. Jedoch ist die Signalkaskade über die diese Veränderungen stattfinden noch unbekannt (Glass et al. 1994, Glass et al. 2000).

## 7. Literaturverzeichnis

- Albelda SM. 1993. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest*, 68 (1):4-17.
- Aletsee-Ufrecht MC, Langley K, Gratzl O, Gratzl M. 1990. Differential expression of the neural cell adhesion molecule NCAM 140 in human pituitary tumors. *FEBS Lett*, 272 (1-2):45-49.
- Asa SL, Ezzat S. 1998. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*, 19 (6):798-827.
- Barker FG, Prados MD, Chang SM. 1996. Radiation response and survival time in patient with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*, 84:442-8.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. 2003. Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361 (9354):323-331.
- Berardi M, Hindelang C, Laurent-Huck FM, Langley K, Rougon G, Felix JM, Stoeckel ME. 1995. Expression of neural cell adhesion molecules, NCAMs, and their polysialylated forms, PSA-NCAMs, in the developing rat pituitary gland. *Cell Tissue Res*, 280 (2):463-472.
- Bernstein JJ, Woodard CA. 1995. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery*, 36 (1):124-132; discussion 132.
- Beschet I, Brunon J, Scoazec JY, Mosnier JF. 1999. Expression of beta1 and beta4 integrins in normal arachnoid membrane and meningiomas. *Cancer*, 86 (12):2649-2658.
- Bussolati B, Grange C, Bruno S, Buttiglieri S, Deregibus MC, Tei L, Aime S, Camussi G. 2006. Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res*, 312 (6):913-924.

- Cavallaro U, Christofori G. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*, 1014:58-66.
- Cervos-Navarro J, Ferszt R. 1989. *Klinische Neuropathologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS. 2002. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol*, 20(4):1063-8.
- Chang H, Bartlett ES, Patterson B, Chen CI, Yi QL. 2005. The absence of CD56 in malignant plasma cells in the cerebrospinal fluid is the hallmark of multiple myeloma involving central nervous system. *B J Haematol*, 129 (4): 539-41.
- Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci*, 20 (4):1446-1457.
- Cole GJ, Glaser L. 1986. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol*, 102 (2):403-412.
- Crnic I, Strittmatter K, Cavallaro U, Kopfstein L, Jussila L, Alitalo K, Christofori G. 2004. Loss of neural cell adhesion molecule induces tumor metastasis by up-regulating lymphangiogenesis. *Cancer Res*, 64 (23):8630-8638.
- DakoCytomation.ChemMate <sup>TM</sup> Detection Kit, Alkaline Phosphatase/ RED, Rabbit/ Mouse. Instruction Manual.
- Daniel L, Trouillas J, Renaud W, Chevallier P, Gouvernet J, Rougon G, Figarella-Branger D. 2000. Polysialylated-neural cell adhesion molecule expression in rat pituitary transplantable tumors (spontaneous mammotropic transplantable tumor in Wistar-Furth rats) is related to growth rate and malignancy. *Cancer Res*, 60 (1):80-85.

- Dehdashti AR, Hegi MR, Regli L, Pica A, Stupp R. 2006. New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide chemotherapy. *Neurosurg Focus*, 20 (4): E6.
- De Jong I, Aylwin SJ, Olabiran Y, Geddes JF, Monson JP, Wood DF, Burrin JM. 1999. Expression and secretion of neural cell adhesion molecules by human pituitary adenomas. *Ann clin Biochem*, 36 (Pt5): 660-5.
- Demuth T, Berens ME. 2004. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*, 70 (2):217-228.
- Edvardsen K, Brunner N, Spang-Thomsen M, Walsh FS, Bock E. 1993a. Migratory, invasive and metastatic capacity of NCAM transfected rat glioma cells. *Int J Dev Neurosci*, 11 (5):681-690.
- Edvardsen K, Chen W, Rucklidge G, Walsh FS, Obrink B, Bock E. 1993b. Transmembrane neural cell-adhesion molecule (NCAM), but not glycosyl-phosphatidylinositol-anchored NCAM, down-regulates secretion of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24):11463-11467.
- Fearon ER, Pierceall WE. 1995. The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer Surv*, 24:3-17.
- Figarella-Branger D, Dubois C, Chauvin P, De Victor B, Gentet JC, Rougon G. 1996. Correlation between polysialic-neural cell adhesion molecule levels in CSF and medulloblastoma outcomes. *J Clin Oncol*, 14 (7):2066-2072.
- Figarella-Branger D, Roche PH, Daniel L, Dufour H, Bianco N, Pellissier JF. 1997. Cell-adhesion molecules in human meningiomas: correlation with clinical and morphological data. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23 (2):113-122.

- Figarella-Branger D, Lepidi H, Poncet C, Gambarelli D, Bianco N, Rougon G, Pellissier JF. 1995. Differential expression of cell adhesion molecules (CAM), neural CAM and epithelial cadherin in ependymomas and choroid plexus tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 89 (3):248-257.
- Fogar P, Basso D, Pasquali C, De Paoli M, Sperti C, Roveroni G, Pedrazzoli S, Plebani M. 1997. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. *Anticancer Res*, 17 (2B):1227-1230.
- Frotscher M, Kahle W. 2000. Taschenatlas der Anatomie in 3. Nervensystem und Sinnesorgane. Siebte Aufl. Frankfurt, Kiel: Georg Thieme Verlag.
- Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E, Ben-Ze'ev A. 2007. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res*, 67(16): 7703-7712.
- Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut NM, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. 2007. Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basa-like phenotype. *Hum Pathol*, 38(6):830-41.
- Garin-Chesa P, Fellingner EJ, Huvos AG, Beresford HR, Melamed MR, Triche TJ, Rettig WJ. 1991. Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules. Differential expression in small round cell tumors of childhood and adolescence. *Am J Pathol*, 139 (2):275-286.
- Glass JD, Lee W, Shen H, Watanabe M. 1994. Expression of immunoreactive polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology*, 60 (1):87-95.
- Glass JD, Shen H, Fedorkova L, Chen L, Tomasiewicz H, Watanabe M. 2000. Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 280 (3):207-210.

- Glass JD, Watanabe M, Fedorkova L, Shen H, Ungers G, Rutishauser U. 2003. Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 117 (1):203-211.
- Gratsa A, Rooprai HK, Rogers JP, Martin KK, Pilkington GJ. 1997. Correlation of expression of NCAM and GD3 ganglioside to motile behaviour in neoplastic glia. *Anticancer Res*, 17 (6B):4111-4117.
- Greenberg MS. 2006. *Handbook of Neurosurgery*. Sixth edition New York: Thieme Verlag.
- Grieb P. 2004. 5-Aminolevulinic acid (ALA) and its applications in neurosurgery. *Neurol Neurochir Pol*. 38 (3): 201-7.
- Grundmann E, Hrsg. 1986. *Farbatlas der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie*. Dritte Aufl. München: Urban und Schwarzenberg.
- Hakansson J, Xian X, He L, Stahlberg A, Nelander S, Samuelsson T, Kubista M, Semb H. 2005. Neural cell adhesion molecule-deficient beta-cell tumorigenesis results in diminished extracellular matrix molecule expression and tumour cell-matrix adhesion. *Tumour Biol*, 26 (2):103-112.
- Hamilton JM, Murphy C, Paulsen JS. 1999. Odor detection, learning, and memory in Huntington's disease. *J Int Neuropsychol Soc*, 5 (7):609-615.
- Hatten ME. 1987. Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J Cell Biol*, 104 (5):1353-1360.
- Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ. 1986. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. I. Production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity. *J Biol Chem*, 261 (6):2810-2813.
- Huang CX, Hu SX, Chen B. 2001. Expression of the neural cell adhesion molecule in human astrocytomas. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26 (6):543-545.

- Huerta S, Srivatsan ES, Venkatesan N, Peters J, Moatamed F, Renner S, Livingston EH. 2001. Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery*, 130 (5):834-843.
- Hundemer M, Klein U, Hose D, Raab MS, Cremer FW, Jauch A, Benner A, Heiss C, Moos M, Ho AD, Goldschmidt H. 2007. Lack of CD56 expression on myeloma cells is not a marker for poor prognosis in patients treated by high-dose chemotherapy and is associated with translocation t(11;14). *Bone Marrow Tansplant*, 40(11):1033-7.
- Ikeda H, Yoshimoto T, Fujiwara K, Ogawa Y. 1995. Immunohistochemical demonstration of tenascin in human pituitary glands and adenomas. *Acta Histochem*, 97(3): 273-80.
- Ishihara R, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Fukushima T, Sakatani K. 2007. Quantitative Spectroscopic Analysis of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence Intensity in Diffusely Infiltrating Astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 47: 53-57.
- Keles GE, Anderson B, Berger MS. 1999. The effect of extend of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol*, 52: 371-9.
- Kleihues P, Cavenee WK, Hrsg 2000. *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. Lyon: World Health Organization. Classification of tumours.
- Kleinig K, Sitte P. 1999. *Zellbiologie*. Vierte Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Orr EA, Savelieva E, Owens GC, Kruse CA. 1999. Paucity of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) nuclear immunostaining in gliomas and inability of retinoic acid to influence neural cell adhesion molecule (NCAM) expression. *J Neurooncol*, 41 (1):31-42.
- Kohn EC, Liotta LA. 1995. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*, 55 (9):1856-1862.



- Kraj M, Sokolowska U, Kopec-Szlezak J, Poglod R, Kruk B, Wozniak J, Szpila T. 2008. Clinicopathological correlates of plasma cell CD56 (NCAM) expression in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 49(2): 298-305.
- Krushel LA, Sporns O, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM. 1995. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits astrocyte proliferation after injury to different regions of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (10):4323-4327.
- Lackie PM, Zuber C, Roth J. 1990. Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression. *Development*, 110 (3):933-947.
- Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E. 1998. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol*, 22 (10):1267-1276.
- Leonhardt H. 1990. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Achte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Liotta LA, Thorgiersson UP, Garbisa S. 1982. Role of collagenases in tumour cell invasion. *Cancer Metstasis*, 1: 277-288.
- Lombardi D, Scheithauer BW, Meyer FB, Forbes GS, Shaw EG, Gibney DJ, Katzmann JA. 1991. Symptomatic subependymoma: a clinicopathological and flow cytometric study. *J Neurosurg*, 75 (4):583-588.
- Lopes MB, Altermatt HJ, Scheithauer BW, Shepherd CW, VandenBerg SR. 1996. Immunohistochemical characterization of subependymal giant cell astrocytomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 91 (4):368-375.
- Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. 2002. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell*, 1 (2):125-128.

- Markovic-Lipkovski J, Müller CA, Klein G, Flad T, Klatt T, Blaschke S, Wessels JT, Müller GA. 2007. Neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 22(6): 1558-66.
- Morantz RA. 1987. Radiation therapie in the treatment of cerebral astrocytomas. *Neurosurgery*, 20: 975-82.
- Maidment SL, Rucklidge GJ, Rooprai HK, Pilkington GJ. 1997. An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett*, 116 (1):71-77.
- Nakano A, Tani E, Miyazaki K, Yamamoto Y, Furuyama J. 1995. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *J Neurosurg*, 83 (2):298-307.
- Nihei K, Kowall NW. 1992. Neurofilament and neural cell adhesion molecule immunocytochemistry of Huntington`s disease striatum. *Ann Neurol*, 31(1):59-63.
- Okazaki H. 1983. *Fundamentals of Neuropathology*. Erste Aufl. New York: Igaku-Shoin.
- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. 1993. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol*, 143 (1):154-163.
- Perl AK, Dahl U, Wilgenbus P, Cremer H, Semb H, Christofori G. 1999. Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells. *Nat Med*, 5 (3):286-291.
- Pilkington GJ. 1997. The paradox of neoplastic glial cell invasion of the brain and apparent metastatic failure. *Anticancer Res*, 17 (6B):4103-4105.
- Poeck K, Werner H. 2001. *Neurologie*. 11. Auflage Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

- Prag S, Lepekhin EA, Kolkova K, Hartmann-Petersen R, Kawa A, Walmod PS, Belman V, Gallagher HC, Berezin V, Bock E, Pedersen N. 2002. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci*, 115 (Pt 2):283-292.
- Quigley MR, Maroon JC. 1991. The relationship between survival and the extend of resection in patients with supratentorial malignant gliomas. *Neurosurgery*, 29: 385-9.
- Ramsay AD, Bates AW, Williams S, Sebire NJ. 2008. Variable antigen expression in hepatoblastomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 16(2): 140-7
- Ray D, Melmed S. 1997. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev*, 18 (2):206-228.
- Roesler J, Srivatsan E, Moatamed F, Peters J, Livingston EH. 1997. Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma. *Am J Surg*, 174 (3):251-257.
- Ronn LC, Hartz BP, Bock E. 1998. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol*, 33 (7-8):853-864.
- Rose SP. 1995. Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends Neurosci*, 18 (11):502-506.
- Saeger W, Lubke D. 1996. Pituitary Carcinomas. *Endocr Pathol*, 7 (1):21-35.
- Sadanandam A, Varney ML, Kinarsky L, Ali H, Mosley RL, Singh RK. 2007. Identification of functional cell adhesion molecules with a potential role in metastasis by a combination of in vivo phage display and in silico analysis. *OMICS*, 11(1): 41-57.
- Sahara N, Takeshita A. 2004. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma*, 45(1): 61-5.
- Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. 2004. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol*, 16 (6):607-613.

- Sasaki H, Yoshida K, Ikeda E, Asou H, Inaba M, Otani M, Kawase T. 1998. Expression of the neural cell adhesion molecule in astrocytic tumors: an inverse correlation with malignancy. *Cancer*, 82 (10):1921-1931.
- Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN, McCutcheon IE, Stetler-Stevenson WG, Nicolson GL, Rao JS. 1996. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis*, 14(1):35-42.
- Schaefer HE, Riede UN, Hrsg. 2001. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Schirmer M. 2005. *Neurochirurgie*. 10. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag.
- Shih LM, Hsu MY, Palazzo JP, Herlyn M. 1997. The cell-cell-adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am J Pathol*, 151(3): 745-751.
- Smith SR, Auerbach B, Morgan L. 1996. Serum neural cell adhesion molecule in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Br J Haematol*, 92(1): 67-70.
- Sporns O, Edelmann GM, Crossin KL. 1995. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:542-546.
- Stepp H, Beck T, Pongratz T, Meinel T, Kreth FW, Tonn JCh, Stummer W. 2007. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *Environ Pathol Toxicol Oncol*, 26 (2): 157-64.
- Stewart LA. 2002. Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, 359(9311): 1011-8.

- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7 (5): 392-401.
- Sullivan PF, Keefe RS, Lange LA, Lange EM, Stroup TS, Lieberman J, Maness PF. 2006. NCAM1 and Neurocognition in Schizophrenia. *Biol Psychiatry*,
- Taniguchi S, Takeoka M, Ehara T, Hashimoto S, Shibuki H, Yoshimura N, Shigematsu H, Takahashi K, Katsuki M. 2001. Structural fragility of blood vessels and peritoneum in calponin h1-deficient mice, resulting in an increase in hematogenous metastasis and peritoneal dissemination of malignant tumor cells. *Cancer Res*, 61 (20):7627-7634.
- Tews DS, Nissen A. 1998. Expression of adhesion factors and degrading proteins in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *Invasion Metastasis*, 18 (5-6):271-284.
- Tezel E, Kawase Y, Takeda S, Oshima K, Nakao A. 2001. Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. *Pancreas*, 22 (2):122-125.
- Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2 (6):442-454.
- Thies A, Pfuller U, Schachner M, Horny HP, Molls I, Schumacher U. 2001. Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res*, 21 (4B):2883-2887.
- Todaro L, Christiansen S, Varela M, Campodonico P, Pallotta MG, Lastiri J, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L. 2007. Alteration of serum and tumoral neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in patients with brain tumors. *J Neurooncol*.
- Tonn JC, Goldbrunner R. 2003. Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl*, 88:163-167.

- Trepel M. 1999. Neuroanatomie. Zweite überarbeitete Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag.
- Trouillas J, Daniel L, Guigard MP, Tong S, Gouvernet J, Jouanneau E, Jan M, Perrin G, Fischer G, Tabarin A, Rougon G, Figarella-Branger D. 2003. Polysialylated neural cell adhesion molecules expresses in human pituitary tumors and related to extraselar invasion. J Neurosurg, 98(5): 1084-93.
- van der Borgh K, Brundin P. 2006. Reduced expression of PSA-NCAM in the hippocampus and piriform cortex of the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease. Exp Neurol.
- Weller M, Westphal M, Schlegel U, Hrsg. 2003. Neuroonkologie. Zweite erweiterte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Welsch U, Hrsg. 2005. Atlas Histologie. Siebte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Welsch U, Hrsg. 2003. Lehrbuch für Histologie. München: Urban & Fischer Verlag.
- Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR. 1998. Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study. Neuropathol Appl Neurobiol, 24 (4):302-308.
- Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. 2001. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. Neuropathol Appl Neurobiol, 27 (4):305-313.
- Winter C, Pawel B, Seiser E, Zhao H, Raabe E, Wang Q, Judkins AR, Attiyeh E, Maris JM. 2008. Neural cell adhesion molecule (NCAM) isoform expression is associated with neuroblastoma differentiation status. Pediatr Blood Cancer, Jan 22.
- Xian X, Hakansson J, Stahlberg A, Lindblom P, Betsholtz C, Gerhardt H, Semb H. 2006. Pericytes limit tumor cell metastasis. J Clin Invest, 116 (3):642-651.

## **8. Danksagung**

Mein inniger Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützten und ohne die diese Ausbildung nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Kalff und Frau Dr. med. S. A. Kuhn für die Vergabe des Promotionsthemas, die hilfreiche Unterstützung bei dessen Bearbeitung und die Beratung bei der Fertigstellung der Promotionsarbeit sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. D. Katenkamp für die Bereitstellung aller technischen Medien und der Labore sowie die guten Möglichkeiten, alle Arbeiten auszuführen.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. med. M. Brodhun aus dem Institut für Pathologie in Jena für die Unterstützung bei der Lösung von theoretischen, sowie praktischen Problemen bedanken, die maßgeblich mit zum Erstellen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Martin aus dem Institut für Pathologie danke ich für Ihre Unterstützung und Beratung bei praktischen Aufgaben.

Herrn PD Dr. med. R. Bauer aus dem Institut für Pathophysiologie der Universität Jena danke ich für die Bereitstellung des Imagearbeitsplatzes und für die hilfreichen experimentellen Anregungen.

Frau Dr. rer. nat. K. Hofmann gilt mein herzlicher Dank. Sie hat mich bei der statistischen Bearbeitung meiner Daten und bei der interdisziplinären Zusammenarbeit im Forschungszentrum Lobeda unterstützt.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Doktoranden und Diplomanden des neuroonkologischen Forschungslabors der neurochirurgischen Klinik für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

## **9. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. S. A. Kuhn, Dr. med. M. Brodhun, PD Dr. med. R. Bauer, Dr. rer. nat. K. Hofmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

das ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 08.05.2008

---

Pedro Dünisch



## **Curriculum vitae**

### **Pedro Dünisch**

Sanddornstrasse 2  
07747 Jena (Saale)  
Telefon 0176 / 21957867  
Mail: [P.duenisch@t-online.de](mailto:P.duenisch@t-online.de)

Geboren am 27.09.1980 in Suhl / Thüringen  
ledig, keine Kinder



Jena, den 08.05.2008

## **Promotion**

seit 08.2004

*Thema:* Expressionsanalyse des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls Isoform 140 (NCAM-140) in humanen Gliomen im Vergleich zu anderen Hirntumoren und zu zerebralem Autopsiegewebe

## **Studium**

10.2001-04.2008

Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

10.2007-12.2007

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Abschluss des Studiums Humanmedizin mit der Note: Gut

08.2006-07.2007

### **Praktisches Jahr:**

*Innere Medizin* bei Prof. Dr. med. Figulla  
Zentrale Notaufnahme, FSU-Jena

*Chirurgie* bei Prof. Dr. med. J. Gummert  
Abteilung für Herz- u. Thoraxchirurgie, FSU-Jena

*Wahlfach* bei Prof. Dr. med. R. Kalff ,  
Neurochirurgie, FSU-Jena

### **Famulaturen:**

Allgemein-u.Viszeralchirurgie bei MR. Dr. med. D. Rose  
Kreiskrankenhaus Arnstadt

Neurochirurgie bei Prof. Dr. med. R. Kalff  
FSU-Jena

Allgemeinmedizin bei Dr. med. P. Hermann  
Praxis für Allgemeinmedizin, Meiningen

Neurochirurgie bei Prof. Dr. med. R. Kalff  
FSU-Jena

## **Studienbegleitende Tätigkeiten**

10.2001-06.2002

Zertifikat Laserschutzbeauftragter für medizinische Lasersysteme gemäß „Laserstrahlung“ (VBG 93) bei PD. Dr. rer. nat. K. Jönig, FSU Jena

07.2002-10.2004

Tutorentätigkeit im Institut für Anatomie I der Friedrich-Schiller-Universität in Jena unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Linß

10.2002- 11.2003	Kurs „Anatomie am Lebenden“ im Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität in Jena unter der Leitung von Prof. Dr. G. Jirikowski
------------------	--

### **Wehrdienst**

07.2000-09.2000 09.2000-04.2001	Panzerartilleriebataillon 285, 72525 Münsingen Panzerpionierkompanie 300, 91719 Heidenheim
------------------------------------	---

### **Schulbildung**

07.1987-07.1997	Realschule Großbreitenbach Abschluss mittlere Reife: mit Auszeichnung
-----------------	--

08.1997-06.2000	Abitur am Wirtschaftsgymnasium Ilmenau Abschluß Hochschulreife: mit Auszeichnung
-----------------	---

### **Sonstige Kenntnisse**

Sprachen	Englisch, Französisch
----------	-----------------------

EDV	Windows XP, Vista MS Word, MS Excel, MS Power Point, Palm OS Win XP Foto und Videobearbeitung
-----	---

Führerschein	1b, 3
--------------	-------

Hobbys	PC, Auto, Karnevalverein, Fahrradfahren, Volleyball, Schach
--------	---

Jena, den 08.05.2008

Pedro Dünisch